

500,841
Rec'd PCT/PTO 07 JUL 2004

特許協定の基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2003 年 7 月 24 日 (24.07.2003)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 03/060131 A1

(51) 国際特許分類:
15/12, 9/10, C07K 14/515, A61K 38/17

C12N 15/54,

(74) 代理人: 岩谷 龍 (IWATANI, Ryo); 〒530-0003 大阪府
大阪市 北区堂島 2 丁目 1 番 2 7 号 桜橋千代田ビル
5 階 Osaka (JP).

(21) 国際出願番号: PCT/JP02/13879

(22) 国際出願日: 2002 年 12 月 27 日 (27.12.2002)

(81) 指定国 (国内): AU, BR, CA, CN, IL, JP, KR, US.

(25) 国際出願の言語: 日本語

(84) 指定国 (広域): ヨーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SI, SK, TR).

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願 2002-2056 2002 年 1 月 9 日 (09.01.2002) JP

規則 4.17 に規定する申立て:

— AU, BR, CA, CN, IL, JP, KR, ヨーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SI, SK, TR) の指定のための出願し
及び特許を与えられる出願人の資格に関する申立て
(規則 4.17(ii))
— US のみのための発明者である旨の申立て (規則 4.17(iv))

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): サントリー株式会社 (SUNTORY LIMITED) [JP/JP]; 〒530-8203 大阪府 大阪市 北区堂島浜 2 丁目 1 番 4 0 号 Osaka (JP).

(72) 発明者: および

(73) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 谷口 直之 (TANIGUCHI, Naoyuki) [JP/JP]; 〒560-0013 大阪府 豊中市 上野東 2-19-3 2-201 Osaka (JP). 三善 英知 (MIYOSHI, Eiji) [JP/JP]; 〒560-0005 大阪府 豊中市 西緑丘 2-6-30 603 号 Osaka (JP). 斉藤 貴志 (SAITO, Takashi) [JP/JP]; 〒351-0101 埼玉県 和光市 白子 2-15-5 エクセル滝坂 101 号 Saitama (JP).

添付公開書類:

— 国際調査報告書

2 文字コード及び他の略語については、定期発行される各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: SUGAR TRANSFERASE GnT-V HAVING ANGIOGENIC EFFECT

(54) 発明の名称: 血管新生作用を有する糖転移酵素 G n T-V

(57) Abstract: A peptide or a protein having an angiogenic effect and containing the basic amino acid cluster region of β 1,6-N-acetylglucosaminyl transferase; an angiogenesis promoter containing the above peptide or protein; a method of screening a substance inhibiting the above peptide or protein; and an angiogenesis inhibitor containing the above inhibitory substance.

(57) 要約:

本発明は、血管新生作用を有し、 β 1, 6-N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼの塩基性アミノ酸クラスター領域を含むペプチド又はタンパク質、前記ペプチド又はタンパク質を含む血管新生促進剤、前記ペプチド又はタンパク質の阻害物質のスクリーニング方法、及び前記阻害物質を含む血管新生阻害剤を提供する。

WO 03/060131 A1

明 細 書

血管新生作用を有する糖転移酵素G n T－V

5 技術分野

本発明は、分泌型の糖転移酵素、N－アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ－V (以下、G n T－Vと略称する)の血管新生作用、当該血管新生作用に関わるG n T－Vの塩基性アミノ酸クラスター、G n T－Vの血管新生促進剤としての利用、G n T－V及びG n T－Vの塩基性アミノ酸クラスターの阻害剤のスクリーニング方法、該スクリーニング方法によって得られた物質、分泌型G n T－Vの産生を阻害する物質のスクリーニング方法、当該スクリーニング方法によって得られた物質、及び該物質の血管新生阻害剤としての利用に関する。

15 背景技術

癌の増殖には、繊維芽細胞増殖因子－2 (F G F－2)、血管内皮細胞増殖因子 (V F G F) 及びインターロイキン－8 (I L－8) などの因子が関与している。これらの因子及びサイトカインの産生は、遺伝子発現の増大、遺伝子産物の翻訳後の修飾及び細胞外マトリックスとの相互作用などの複雑なメカニズムによって制御されている。

多くの増殖因子とそのレセプターは糖タンパク質であり、そのうちの幾つかは腫瘍組織での血管新生に関与している。糖転移酵素遺伝子を用いた最近の研究において、増殖因子レセプターのオリゴ糖構造の変化が細胞内シグナル伝達の変化をもたらし、このことが細胞の癌化につながるということが明らかにされている (Yamashita, K., et al., J. Biol. Chem. 260, 3963-3969 (1985). Pierce, M & Arango, J., J. Biol. Chem. 261, 10772-10777 (1986). Zhu, T.Y., et al.,

J. Cancer Res. Clin. Oncol. 123, 296-299 (1997). Petretti, T., et al., Gut 46, 359-366 (2000)). アスパラギン糖鎖の β (1, 6) 分岐の形成を触媒する β 1, 6-N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ V (GnT-V; β 1, 6-N-acetylglucosaminyltransferase V) は、癌の転移に關与する最も重要な糖転移酵素であることが提唱されている (Demetriou, M., et al., J. Cell Biol. 130, 383-392 (1995). Dennis, J.W., et al., Science 236, 582-585 (1987))。

血管新生は、癌の転移や増殖などの癌の進行において必須の段階である (Folkman, J., N. Eng. J. Med. 285, 1182-1186 (1971). Folkman, J. Ann. Surg. 175, 409-416 (1972))。GnT-Vが欠損したトランスジェニックマウスを用いた最近の研究によれば、GnT-Vは癌の増殖と癌の転移に必須であることが直接示された (Granovsky, M., et al., Nature Med. 6, 306-312 (2000))。臨床研究によれば、肺及び肝臓の悪性腫瘍においてGnT-V活性の上昇が示されている。ヒト肺癌細胞においては、GnT-V活性と腫瘍のサイズに正の相関関係があることが示され (Dennis, J.W. & Laferte, S., Cancer Res. 49, 945-950 (1989))、ヒト大腸癌組織におけるGnT-Vの発現が、予後の悪化と転移に關係していること (Murata, K., et al., Clin. Cancer Res. 6, 1772-1777 (2000)) が明らかにされている。しかしながら、GnT-Vを介する癌の増殖・転移の詳細なメカニズムについては、まだ明らかにされていない。

糖タンパク質中に見いだされるアスパラギン型糖鎖 (Asn型糖鎖) は、その構成糖及び分岐の型から高マンノース型、複合型及び混合型の3タイプに分類される。これらAsn型糖鎖の生合成は、先ず、粗面小胞体の内腔側で脂質中間体からその糖鎖部分が、翻訳中のポリペプチド鎖のアスパラギンにひとまとめに転移されることから始まる。その後、粗面小胞体でグルコースと一部のマンノースが除去されるが、一部の粗面小胞体局在性のAsn型糖鎖をもつ糖タンパク質はこのままとどまるため、高マンノース型糖鎖のままとなる。その

他のオルガネラ糖タンパク質、細胞表層糖タンパク質あるいは分泌糖タンパク質は、ベシクル輸送によりゴルジ体に移り、さらにマンノースが除去される。このゴルジ体では、ゴルジ体酵素であるN-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ群の作用によりN-アセチルグルコサミンが導入され、分枝構造をとるようになる。この分枝構造の形成により、高マンノース型糖鎖から混成型糖鎖及び複合型糖鎖への変換が始まり、フコースの導入、また、トランスゴルジ領域でのガラクトースの導入を経て、最後に、シアル酸が導入されてA s n型糖鎖の生合成が完成する。

これら一連のA s n型糖鎖合成のそれぞれのステップで、種々の酵素が触媒として働いていることがわかっている。そのうち、A s n型糖鎖の種々の分枝構造の形成における、N-アセチルグルコサミンの転移導入反応を触媒している酵素として、6種のN-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼが知られている。Schachterら (Brockhausen, I., et al., Biochem. Cell Biol., 66, 1134(1988)) は、 $\text{Man } \alpha 1-3 (\text{Man } \alpha 1-6) \text{Man } \beta 1-4 \text{GlcNAc } \beta 1-4 \text{GlcNAc}$ のトリマンノシル構造のコア構造に、N-アセチルグルコサミンを転移するこの6種の酵素をGnT-IないしGnT-VIと命名した。このうち、GnT-Vは、 $\beta (1, 6) \text{branch}$ 構造 ($-\text{[GlcNAc } \beta (1, 6) \text{Man } \alpha (1, 6) \text{Man}] -$) の形成に関わる酵素である。 $\beta (1, 6) \text{branch}$ 構造は、細胞の形質転換株や腫瘍形成性細胞に、顕著に増加している事が知られている (Pierce, M., et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 146, 679-684(1987) 及び Arango, J., & Pierce, M., J., Cell. Biochem., 257, 13421-13427(1982))。また、腫瘍形成性細胞の癌転移能と $\beta (1, 6) \text{branch}$ の出現との間に関連があることが示されている (Hiraizumi, et al., A., Arch. Biochem. Biophys. 280, 9-19(1990))。ヒトでも、乳癌の生検例において、50%の例で $\beta (1, 6) \text{branch}$ の発現が亢進していると報告されている (Dennis, J.W., & Laferte, S. Cancer Res.

49, 945-950(1989))。いずれの場合でも、 β (1, 6) b r a n c h構造の出現は、G n T-V活性の上昇をともなっていることがわかっている。このように、G n T-Vは、糖鎖生合成経路において β (1, 6) b r a n c h構造の形成を触媒する点で重要であるばかりでなく、癌細胞の易転移能及び悪性度と
5 関連するという点においても、重要な鍵となる酵素である。

発明の開示

本発明は、上記の実情を鑑みてなされたものであり、その目的は糖転移酵素 G n T-Vの癌転移・増殖において果たす役割を解明することにより、癌治療
10 における最も重要な課題である癌転移・増殖に係る新たな治療ターゲット、治療剤、治療剤を見出すスクリーニング方法、評価方法、診断方法を提供することである。本発明はまた、G n T-Vが癌転移並びに血管新生を促進するという新たな生化学的概念を提供することにより、G n T-Vの分泌或いは発現の阻害は、癌転移の抑制だけではなく転移部位の癌増大に係る要因である血管新
15 生を抑制することをも含めた新たな治療概念を提供するものでもある。また更に、血管新生を肯定的因子として捉えれば、血管損傷などに起因する血流障害による各種の虚血性疾患の新たな創薬ターゲットを提供するものである。

発明者らは、糖転移酵素の一つであるG n T-Vが、本来の糖転移酵素としての機能とは全く異なる新たな機能として、癌の転位及びその後の癌の増殖に
20 において、最初の規制段階である血管新生を促進する作用を有することを見出した。即ち、分泌型G n T-V並びに精製された組換えG n T-Vは、in vitro 及び in vivo において生理的濃度で血管新生を促進する。さらに、G n T-Vのアミノ酸配列中に、細胞表面及び細胞外マトリックスにおいてヘパラン硫酸プロテオグリカン(HSPG)から繊維芽細胞増殖因子(FGF-2)を遊離する作用を示す、
25 塩基性アミノ酸を高度に含む塩基性アミノ酸クラスター領域が存在することを確認した。本発明の一つは、G n T-Vの塩基性アミノ酸クラスター領域のア

ミノ酸配列を有するペプチド又はタンパク質、及び当該ペプチド又はタンパク質を含有する血管新生促進剤である。

本発明は、糖転移酵素G n T－V及び当該糖転移酵素の塩基性アミノ酸クラスター領域のアミノ酸配列を有するペプチド（塩基性ペプチド）が癌細胞表層のHSPGからFGF-2を遊離することによって血管新生を促進し、癌転移・増殖を促進することを知見した。本発明は、かかる知見に基づいて想到した、G n T－V及び上記塩基性ペプチドによる血管新生を阻害する化合物のスクリーニング方法、当該スクリーニング方法で得られた化合物、及び該化合物を含有する血管新生阻害剤である。より具体的には、下記物質のスクリーニング方法、該スクリーニング方法によって得られた化合物、及び該化合物を含有する血管新生阻害剤である。

- (a) G n T－V及び塩基性ペプチドによる血管新生作用を阻害する物質
- (b) ゴルジ体にある成熟型G n T－Vを切断して分泌型G n T－Vに変換するプロテアーゼを阻害する物質
- (c) G n T－Vの遺伝子発現を阻害する物質
- (d) G n T－V及び塩基性ペプチドによるヘパラン硫酸プロテオグリカンからのFGF－2の遊離を阻害する物質
- (e) 分泌型G n T－Vが細胞外に分泌されるのを阻害する物質

すなわち、本発明は、

- (1) 血管新生作用を有し、 β 1, 6－N－アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼの塩基性アミノ酸クラスター領域を含むペプチド又はタンパク質、
- (2) β 1, 6－N－アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼが、下記性質；
- (i) 作用：UDP－N－アセチルグルコサミンをドナー基質としてN－アセ

チルグルコサミンを α -6-D-マンノシドに転移させ；

(ii) 基質特異性：GnGn-bi-PAを受容体とした時の基質特異性を100%とした場合、GnGnF-bi-PAを受容体とした時の基質特異性が約78%、GnGnGn-tri-PAを受容体とした時の基質特異性が約125%、GnM-PAを受容体とした時の基質特異性が約66%であり；

(iii) 至適pH：6.2-6.3；

(iv) 活性：活性の発現にMn²⁺を必要とせず、また、20mM EDTA存在下においても活性は阻害されず；

(v) 分子量：約73,000（還元剤非存在下SDS-PAGEによる）並びに約73,000及び約60,000（還元剤存在下SDS-PAGEによる）；

(vi) Km値：受容体GnGn-bi-PA及び供与体UDP-GlcNAcに対するKm値は、各々133 μ M及び3.5mMであり；

(vii) 以下のペプチドフラグメントを有する：

15 (a) Thr-Pro-Trp-Gly-Lys、

(b) Asn-Ile-Pro-Ser-Tyr-Val、

(c) Val-Leu-Asp-Ser-Phe-Gly-Thr-Glu-Pro-Glu-Phe-Asn-His-Ala-Asn-Tyr-Ala、

(d) Asp-Leu-Gln-Phe-Leu-Leu、及び

20 (e) Asn-Thr-Asp-Phe-Phe-Ile-Gly

を有することを特徴とする前記（1）に記載のペプチド又はタンパク質、

(3) β 1,6-N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼが、少なくとも配列番号：6で示されるアミノ酸配列を含んで成るアミノ酸配列、又はこのアミノ酸配列において1又は複数のアミノ酸が修飾されているアミノ酸配列を有することを特徴とする前記（1）に記載のペプチド又はタンパク質、

25 (4) 塩基性アミノ酸クラスター領域において、塩基性アミノ酸の数が前

記領域の全アミノ酸数のうちの30%以上を占めることを特徴とする前記(1)に記載のペプチド又はタンパク質、

(5) 塩基性アミノ酸クラスター領域が、少なくとも配列番号: 7で示されるアミノ酸配列、又はこのアミノ酸配列において1又は複数のアミノ酸が修飾されているアミノ酸配列を含んでいることを特徴とする前記(1)に記載のペプチド又はタンパク質、

(6) 前記(1)～(5)に記載のペプチド又はタンパク質を含有することを特徴とする血管新生促進剤、

(7) 創傷治癒剤、又は動脈硬化の予防及び／もしくは治療剤である前記(6)に記載の血管新生促進剤、

(8) 前記(1)～(5)に記載のペプチド又はタンパク質を用いることを特徴とする血管新生阻害剤のスクリーニング方法、

(9) 細胞内で発現した前記(1)～(5)に記載のペプチド又はタンパク質を細胞外に分泌することができる細胞を用いることを特徴とする血管新生阻害剤のスクリーニング方法、

(10) 細胞が、前記(1)～(5)に記載のペプチド又はタンパク質を細胞内で高発現できる細胞であることを特徴とする前記(9)に記載のスクリーニング方法、

(11) ゴルジ体膜にアンカーリングされている成熟型 $\beta 1, 6-N$ -アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼを切断して分泌型 $\beta 1, 6-N$ -アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼに変換するプロテアーゼを用いることを特徴とする血管新生阻害剤のスクリーニング方法、

(12) プロテアーゼが、 β -セクレターゼであることを特徴とする前記(11)に記載のスクリーニング方法、

(13) プロテアーゼが、 γ -セクレターゼであることを特徴とする前記(11)に記載のスクリーニング方法、

(14) 前記(8)～(13)に記載のスクリーニング方法において血管新生阻害作用を示す化合物、

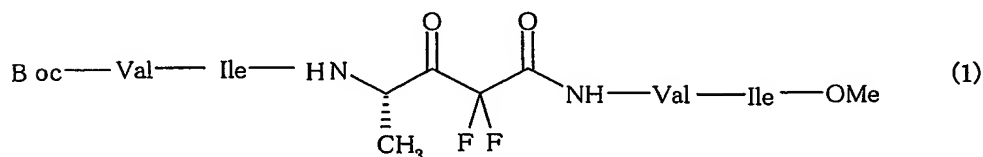
(15) 前記(1)～(5)に記載のペプチド又はタンパク質の発現を抑制することを特徴とする血管新生阻害作用を示す化合物、

5 (16) 前記(1)～(5)に記載のペプチド又はタンパク質がヘパラン硫酸プロテオグリカンに結合するのを抑制することを特徴とする血管新生阻害作用を示す化合物、

(17) 前記(14)～(16)に記載の化合物を含有することを特徴とする血管新生阻害剤、

10 (18) γ -セクレターゼ阻害作用を有する化合物を含有することを特徴とする血管新生阻害剤、

(19) γ -セクレターゼ阻害作用を有する化合物が、下記式(1)；



15 (式中、BocはBoc基を、OMeはメトキシ基を、Valはバリンを、Ileはイソロイシンを表す。)

で示される化合物であることを特徴とする前記(18)に記載の血管新生阻害剤、

(20) 前記(1)～(5)に記載のペプチド又はタンパク質に対する抗体、

20 (21) 前記(20)に記載の抗体を用いることを特徴とする前記(1)～(5)に記載のペプチド又はタンパク質のアッセイ方法、

(22) 前記(20)に記載の抗体を含むことを特徴とする前記(1)～(5)に記載のペプチド又はタンパク質の検出キット、
に関する。

図面の簡単な説明

第1図は、各細胞の培養液で処理されたHUV ECの分化・増殖を、 $[^3\text{H}]$ 一チミジンの取り込み量を指標に示した図である。なお、CRTは、HUV ECの培養に用いた通常の新鮮な培地である。

第2図は、GnT-V Δ 73の添加量と、HUV ECの分化・増殖との関係を示す図である。

第3図Aは、各GnT-V欠失変異体のアミノ酸配列の概略を示す図である。

第3図Bは、各GnT-V欠失変異体によるHUV ECの分化・増殖亢進作用を示す図である。

第4図は、GnT-Vの塩基クラスター領域のアミノ酸配列と、VEGF₁₈₉、P1GF-2及びHB-EGFのアミノ酸配列との類似性を示す図である。

第5図は、GnT-Vの各種欠失変異体及び合成ペプチドによるFGF-2の放出量を示す図である。

第6図は、GnT-Vの各種欠失変異体及び合成ペプチドによるHUV ECの分化・増殖亢進作用を示す図である。

第7図は、GnT-Vによる癌血管新生の誘導を示す概略図である。塩基性アミノ酸クラスター領域を含む分泌型GnT-Vは、FGF-2と競合して細胞表面のHSPGに結合し、その結果、FGF-2の遊離が起こり、標的細胞上のFGF-2レセプターが刺激される。

第8図は、成熟型GnT-Vの構造の概要を示す図である。成熟型GnT-Vがゴルジ体内腔側で切断を受けて分泌型GnT-Vに変換される際の切断部分を拡大し、そのアミノ酸配列を示した。

第9図Aは、変異プレセニリン-1を高発現させた細胞(PS-1 Δ E9)と変異プレセニリン-1を高発現させていない細胞(コントロール)における培養液中のGnT-V活性を示す。第9図Bは、前記2種の細胞における培養液中(細

胞外)と細胞内のGnT-V活性の比を示す。

第10図Aは、何も添加しない場合、DMSOを添加した場合、DMSOに溶解したDFK167を添加した場合、それぞれの場合におけるPaCa-2/GnT-V細胞の培養液中のGnT-V活性の値を示す。第10図Bは、前記3つの場合、

5 それぞれにおけるKB/GnT-V細胞の培養液中のGnT-V活性の値を示す。

発明を実施するための最良の形態

本発明は、 β 1, 6-N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼの塩基性アミノ酸クラスター領域を含むペプチド又はタンパク質を含有する血管新生促進剤を提供する。

上記 β 1, 6-N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼは、公知のものであってよいが、下記の酵素学的性質を有することが好ましい。すなわち、

(a) 作用：N-アセチルグルコサミンをUDP-N-アセチルグルコサミンから α -6-D-マンノシドに転移させ；

15 (b) 基質特異性：GnGn-bi-PAを受容体とした時の基質特異性を100%とした場合、GnGnF-bi-PAを受容体とした時の基質特異性が約78%、GnGnGn-tri-PAを受容体とした時の基質特異性が約125%、GnM-PAを受容体とした時の基質特異性が約66%であり；

(c) 至適pH：6.2-6.3；

20 (d) 活性：活性の発現に Mn^{2+} を必要とせず、また、20mMEDTA存在下においても活性は阻害されず；

(e) 分子量：約73,000 (還元剤非存在下SDS-PAGEによる)並びに約73,000及び約60,000 (還元剤存在下SDS-PAGEによる)；

25 (f) Km値：受容体GnGn-bi-PA及び供与体UDP-GlcNAcに対するKm値は、各々133 μ M及び3.5mMであり；

(g) 以下のペプチドフラグメントを有する：(i) Thr-Pro-Trp-Gly-Lys (配列番号 1), (ii) Asn-Ile-Pro-Ser-Tyr-Val (配列番号 2), (iii) Val-Leu-Asp-Ser-Phe-Gly-Thr-Glu-Pro-Glu-Phe-Asn-His-Ala-Asn-Tyr-Ala (配列番号 3), (iv) Asp-Leu-Gln-Phe-Leu-Leu (配列番号 4) 及び (v) Asn-Thr-Asp-Phe-Phe-Ile-Gly (配列番号 5) という性質である。

本発明において、上記 β 1, 6-N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼとしては、GnT-Vを用いることが好ましい。GnT-Vは、 β (1, 6) branch 構造 (— [GlcNAc- β (1, 6) Man- α (1, 6) Man] —) の形成に関わる酵素である。なかでも、上記 β 1, 6-N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼは、少なくとも配列番号：6で示されるアミノ酸配列を含んで成るアミノ酸配列、又はこのアミノ酸配列において1又は複数のアミノ酸が修飾されているアミノ酸配列を有することがより好ましい。特に、上記酵素は、Nishikawa, et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 198, 318-327 (1994) に記載のアミノ酸配列を有することがさらに好ましい。

上記酵素は、公知の方法により容易に入手することができる。例えば、ヒト由来のGnT-Vは、Shoreibah, M., et al., J. Biol. Chem. 267, 2920-2927 (1992) に記載の方法で、ラット腎よりGnT-Vを単離、精製することにより得ることができる。特開平6-197756号公報に記載の方法で、ヒト肺癌 (小細胞癌) 由来QG細胞の無タンパク質培養上清の濃縮液から単離、精製することができる。なお、当該ヒト肺癌 (小細胞癌) 由来のQG細胞は、Human lung carcinoma SBM331と命名され、1992年8月18日付けで独立法人産業技術総合研究所特許生物寄託センターに受託番号微工研条寄第3967号 (FERM BP-3967) としてブダペスト条約に基づき国際寄託されている。

本発明に係る血管新生促進剤に含まれるペプチド又はタンパク質は、上記 β 1, 6-N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ、好ましくはGnT

ーVの塩基性アミノ酸クラスター領域を含む。前記塩基性アミノ酸クラスター領域は、アミノ酸の総数が5～50程度、好ましくは8～40程度、より好ましくは10～30程度の塩基性アミノ酸を多く含む部分をいう。前記塩基性アミノ酸クラスター領域においては、塩基性アミノ酸の数が前記領域の全アミノ酸数のうちの約30%以上、好ましくは約35～95%程度、より好ましくは約40～90%程度を占めていることが好ましい。

より好ましくは、前記塩基性アミノ酸クラスター領域は、少なくとも配列番号：7で示されるアミノ酸配列を含んでなる。また、前記塩基性アミノ酸クラスター領域は、少なくとも配列番号：7で示されるアミノ酸配列において1又は複数のアミノ酸が修飾されているアミノ酸配列を含んでなるものであってよい。具体的には、(a) この配列番号：7で示されるアミノ酸配列に1又は複数のアミノ酸が付加されており、なお血管新生作用を維持しているペプチド；(b) 前記アミノ酸配列から1又は複数のアミノ酸が除去されており、なお血管新生作用を維持しているペプチド；又は、(c) 前記アミノ酸配列中の1又は複数のアミノ酸が他のアミノ酸により置き換えられており、なお血管新生作用を維持しているペプチド；さらには、(d) 上記のアミノ酸付加修飾、アミノ酸除去修飾及びアミノ酸置換修飾が組合わされた修飾を有し、なお血管新生作用を維持しているペプチドなど、種々の修飾型塩基性アミノ酸クラスター領域が挙げられる。上記アミノ酸の付加、除去及び置換等の修飾をうけるアミノ酸の数は、特に限定されず、当該修飾の目的に依存して決定されるが、具体的には、塩基性アミノ酸クラスター領域のアミノ酸数の30%程度以下、好ましくは約20%程度以下、より好ましくは約10%程度以下である。また、上記アミノ酸の付加、除去及び置換等の修飾は、塩基性のアミノ酸以外において行われていることが好ましい。

本発明に係る血管新生促進剤においては、活性成分である上記ペプチド又はタンパク質そのものであってもよいが、通常、該活性成分と薬理学的に許容さ

れる担体とを自体公知の方法〔製剤技術分野において慣用の方法、例えば日本薬局方（例えば第13改正）に記載の方法等〕にしたがって混合することによって製造される。本発明に係る血管新生促進剤の剤形としては、例えば錠剤（糖衣錠もしくは腸溶錠などのコーティング錠および多層錠を含む。）、カプセル剤（ソフトカプセル、マイクロカプセルを含む）、散剤、顆粒剤、シロップ剤等の経口剤；及び注射剤（例、皮下注射剤、静脈内注射剤、筋肉内注射剤、腹腔内注射剤等）、外用剤（例、経鼻投与製剤、軟膏剤などの経皮製剤等）、坐剤（例、直腸坐剤、膣坐剤等）、ペレット、点滴剤、徐放性製剤（例、徐放性マイクロカプセル等）等の非経口剤が挙げられる。本発明に係る血管新生促進剤は、非経口剤とすることが好ましい。

薬学的に許容される担体としては、製剤素材として慣用の各種有機あるいは無機担体物質が用いられ、固形製剤における賦形剤、滑沢剤、結合剤、崩壊剤；液状製剤における溶剤、溶解補助剤、懸濁化剤、等張化剤、緩衝剤、無痛化剤などが挙げられる。また必要に応じて、防腐剤、抗酸化剤、着色剤、甘味剤などの製剤添加物を用いることもできる。

賦形剤の好適な例としては、例えば乳糖、白糖、D-マンニトール、デンプン、結晶セルロース、軽質無水ケイ酸などが挙げられる。滑沢剤の好適な例としては、例えばステアリン酸マグネシウム、ステアリン酸カルシウム、タルク、コロイドシリカなどが挙げられる。結合剤の好適な例としては、例えば結晶セルロース、白糖、D-マンニトール、デキストリン、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、ポリビニルピロリドンなどが挙げられる。崩壊剤の好適な例としては、例えばデンプン、カルボキシメチルセルロース、カルボキシメチルセルロースカルシウム、クロスカルメロースナトリウム、カルボキシメチルスターチナトリウムなどが挙げられる。

溶剤の好適な例としては、例えば注射用水、アルコール、プロピレングリコール、マクロゴール、ゴマ油、トウモロコシ油などが挙げられる。溶解補助剤

の好適な例としては、例えばポリエチレングリコール、プロピレングリコール、D-マンニトール、安息香酸ベンジル、エタノール、トリスアミノメタン、コレステロール、トリエタノールアミン、炭酸ナトリウム、クエン酸ナトリウムなどが挙げられる。懸濁化剤の好適な例としては、例えばステアリルトリエタノールアミン、ラウリル硫酸ナトリウム、ラウリルアミノプロピオン酸、レシチン、塩化ベンザルコニウム、塩化ベンゼトニウム、モノステアリン酸グリセリンなどの界面活性剤；例えばポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、カルボキシメチルセルロースナトリウム、メチルセルロース、ヒドロキシメチルセルロース、ヒドロキシエチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロースなどの親水性高分子などが挙げられる。等張化剤の好適な例としては、例えば塩化ナトリウム、グリセリン、D-マンニトールなどが挙げられる。緩衝剤の好適な例としては、例えばリン酸塩、酢酸塩、炭酸塩、クエン酸塩などの緩衝液などが挙げられる。無痛化剤の好適な例としては、例えばベンジルアルコールなどが挙げられる。防腐剤の好適な例としては、例えばパラオキシ安息香酸エステル類、クロロブタノール、ベンジルアルコール、フェネチルアルコール、デヒドロ酢酸、ソルビン酸などが挙げられる。抗酸化剤の好適な例としては、例えば亜硫酸塩、アスコルビン酸などが挙げられる。

本発明に係る血管新生促進剤は、哺乳動物（例、ヒト、マウス、ラット、ウサギ、イヌ、ネコ、ウシ、ウマ、ブタ、サル等）に対して用いることができる。

本発明に係る血管新生促進剤の用途は特に限定されないが、創傷治癒剤として用いられることが好ましい。この場合の本剤の投与量は、治療すべき病態の種類、患者の年齢及び体重、症状及び疾患の重篤度などにより異なるので一概には言えないが、約0.01～100mg/kg程度、好ましくは約0.1～50mg/kg程度である。特に、本発明に係る血管新生促進剤を、創傷部位に、液剤、軟膏剤、クリーム剤、ゲル剤、パップ剤等の方法により局所適用し、経皮吸収により創傷を治癒させることが好ましい。外用液剤の場合は、例えば、

上記ペプチド又はタンパク質を約0.001~1000mg/ml、さらに好ましくは約0.01~500mg/mlの濃度で適用することができる。液剤以外の外用剤の場合は、上記ペプチド又はタンパク質を約0.01~10重量%の濃度で含有していることが好ましい。

- 5 また、本発明に係る血管新生促進剤は、動脈瘤；冠動脈硬化症、脳動脈硬化症もしくは末梢動脈硬化症などの動脈硬化症；末梢動脈閉塞、急性心筋梗塞（AMI）、深部静脈血栓、肺塞栓、解離性動脈瘤、一過性脳虚血発作（TIA）、脳卒中及び他の閉塞関連障害；不安定狭心症、汎発性血管内凝固（DIC）、敗血症、外科又は感染性ショック、術後及び分娩後外傷、心肺バイパス外科手術、
- 10 不適合輸血、胎盤早期剥離、血栓性血小板減少性紫斑病（TTP）、蛇毒及び免疫病のごとき過剰凝集による急性又は慢性の腎疾患、炎症、溶血性尿毒症性症候群、対象性末梢性壊死、褥創の治療又は予防に用いることができる。さらに本発明にかかる血管新生促進剤は、血栓溶解剤の作用増強と再閉塞防止、PTCA後の再閉塞防止、透析による血小板減少症の防止、人工血管及び臓器による
- 15 血栓防止に用いることができる。

- 本発明に係る血管新生促進剤を上記用途に用いる場合、その投与量は、血管新生促進剤の用途、治療すべき病態の種類、患者の年齢及び体重、症状及び疾患の重篤度などにより異なるので、一概には言えないが、1日約0.01~100mg/kgであり、好ましくは約0.1~50mg/kgである。特に、
- 20 静脈投与する場合は、その投与量は、1日約0.01~5mg/kgであり、好ましくは約0.04~1.5mg/kgである。この量を1日1~3回程度投与するのが望ましい。

- 本発明の血管新生促進剤において、本発明に係るペプチド及びタンパク質の血管新生作用に悪影響を及ぼさない併用薬剤を用いることができる。併用薬剤
- 25 としては、特に限定されないが、本発明の血管新生促進剤を動脈硬化などの治療又は／及び予防剤として用いる場合は、例えば、高血圧治療薬、高脂血症治

療薬、利尿剤、血栓溶解剤などが挙げられる。

本発明に係る血管新生阻害剤及び併用薬剤の投与時期は限定されず、これらを、投与対象に対し、同時に投与してもよいし、時間差をおいて投与してもよい。併用薬剤の投与量は、臨床上用いられている投与量に準ずればよく、投与
5 対象、投与対象の年齢及び体重、症状、投与時間、剤形、投与方法、組み合わせ等により適宜選択することができる。併用薬剤の投与形態は、特に限定されず、投与時に本発明に係る血管新生促進剤と併用薬剤とが組み合わせられていればよい。

- 10 本発明は、 β 1, 6-N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼの塩基性アミノ酸クラスター領域を含むペプチド又はタンパク質に対する抗体を提供する。前記ペプチド又はタンパク質を抗原とする抗体は、モノクローナル抗体あるいはポリクローナル抗体のいずれでもよい。それらの抗体は、例えば、「タンパク質・酵素の基礎実験法 改訂第2版（堀尾武一編集 南江堂発行 19
15 94年）」又は「Method in Enzymology vol.182 published by ACADEMIC PRESS, INC. 1990」などに記載の公知方法に従って作製することができる。

- また、本発明は、これらの抗体を用いた前記血管新生作用を有するペプチド又はタンパク質のアッセイ方法及び当該アッセイ方法を利用する前記血管新生作用を有するペプチド又はタンパク質の検出キットを提供する。かかるアッセイ
20 イ方法及び検出キットは、種々の用途に利用可能である。例えば、癌の転移において血管新生は必須工程であることから、本発明に係るアッセイ方法及び検出キットを用いて、癌患者の血中又は癌組織における上記血管新生作用を有するペプチド又はタンパク質の有無又は量を測定することにより、癌転移の可能性を知ることができる。

- 25 本発明に係るアッセイ方法及び検出キットにおいては、抗体分子そのものを用いてもよく、また、抗体分子の $F(a b')_2$ 、 $F a b'$ 、あるいは $F a b$ 画分

を用いてもよい。本発明に係るアッセイ方法及び検出キットにおいては、G n T-Vの抗体またはその画分を用いることが好ましい。

前記アッセイ方法又は検査キットの作製は、公知の方法が利用できる。例えば、上記抗体を用いる上記血管新生作用を有するペプチド又はタンパク質の定
5 量法としては、被検液中の抗原量（例えば、タンパク質量）に対応した抗体、
抗原もしくは抗体-抗原複合体の量を化学的又は物理的手段により検出し、こ
れを既知量の抗原を含む標準液を用いて作製した標準曲線より算出する測定方
法などが挙げられる。より具体的には、例えば、ネフロメトリー、競合法、イ
ムノメトリック法またはサンドイッチ法が好適に用いられるが、感度及び特異
10 性の点で、後述するサンドイッチ法を用いるのが特に好ましい。

本発明に係るアッセイ方法の具体的態様を以下に述べるが、本発明は以下の
態様に限られない。すなわち、前記アッセイ方法としては、例えば（i）上述
した血管新生作用を有するペプチド又はタンパク質に対する抗体と、被検液と、
標識化されている上記血管新生作用を有するペプチド又はタンパク質（以下、
15 この欄において単に「標識ペプチド」という）とを競合的に反応させ、該抗体
に結合した標識ペプチドの割合を測定することを特徴とする被検液中の上記血
管新生作用を有するペプチド又はタンパク質の定量法が挙げられる。また、（ii）
上述した血管新生作用を有するペプチド又はタンパク質に対する抗体を担体に
保持させ不溶化する。また、前記不溶化した抗体とは異なる部位を認識する血
20 管新生作用を有するペプチド又はタンパク質に対する抗体を標識する。ついで、
被検液と、担体上に不溶化した抗体と、標識した抗体とを同時あるいは連続的
に反応させる。次いで、担体上に抗原（血管新生作用を有するペプチド又はタ
ンパク質）を介して捕捉されている標識剤の活性又は／及び担体上に捕捉され
なかった標識剤の活性を測定することを特徴とする被検液中の血管新生作用を
25 有するペプチド又はタンパク質の定量法も挙げられる。また、本発明の血管新
生作用を有するペプチド又はタンパク質のアッセイ方法として、かかるペプチ

ド又はタンパク質に対するモノクローナル抗体を用いて血管新生作用を有するペプチド又はタンパク質の定量を行えるほか、組織染色等による検出を行うこともできる。

本発明にかかるアッセイ方法において用いられる標識剤としては、例えば、
5 放射性同位元素、酵素、蛍光物質、発光物質などが挙げられる。前記放射性同位元素としては、例えば、 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^3H 又は ^{14}C などが用いられる。前記酵素としては、安定で比活性の大きなものが好ましく、例えば、 β -ガラクトシダーゼ、 β -グルコシダーゼ、アルカリフォスファターゼ、パーオキシダーゼ、リンゴ酸脱水素酵素などが用いられる。前記蛍光物質としては、例えば、フル
10 オレスカミン、フルオレッセンイソチオシアネートなどが用いられる。前記発光物質としては、例えば、ルミノール、ルミノール誘導体、ルシフェリン、ルシゲニンなどが用いられる。さらに、抗体あるいは抗原と標識剤との結合にビオチン-アビジン系を用いることもできる。

15 本発明は、血管新生阻害剤を提供する。本発明にかかる血管新生阻害剤は（a）上述の血管新生作用を有するペプチド又はタンパク質を用いるスクリーニング方法において血管新生阻害作用を示す化合物、（b）ゴルジ体膜にアンカーリングされている成熟型 β 1, 6-N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼを切断して分泌型 β 1, 6-N-アセチルグルコサミニルトランスフェラー
20 ゼに変換するプロテアーゼの活性を阻害する化合物、（c）上述の血管新生作用を有するペプチド又はタンパク質の発現を抑制する化合物、及び（d）上述の血管新生作用を有するペプチド又はタンパク質がヘパラン硫酸プロテオグリカンに結合するのを抑制する化合物からなる群から選ばれる1以上の化合物を含むことを特徴とする。本発明にかかる血管新生阻害剤は、（e）上述の血管新生
25 作用を有するペプチド又はタンパク質が細胞外に分泌されるのを阻害する化合物を含んでいてもよい。前記（e）の化合物は、上記（a）～（d）の化合物

のうち1種以上と組み合わせて用いることもできる。以下に、上記(a)～(e)の化合物について詳述する。

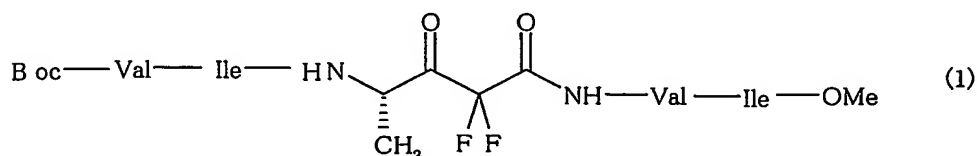
上記(a) 上述の血管新生作用を有するペプチド又はタンパク質を用いるスクリーニング方法において血管新生阻害作用を示す化合物は、下記のようなスクリーニング方法により得ることができる。すなわち、該スクリーニング方法としては、実施例に詳細に記載した血管新生を観察する系において、上述の血管新生作用を有するペプチド又はタンパク質と被検物質とを存在させた場合の血管新生を観察し、被検物質が存在しない場合の血管新生と比較するという方法が挙げられる。かかるスクリーニング方法において、被検物質を存在させた場合の血管新生が、被検物質が存在しない場合の血管新生に比して少ない場合は、かかる被検物質は血管新生阻害作用を示す物質であるといえる。本スクリーニング方法においては、血管新生作用を有するペプチド又はタンパク質としてGnT-Vを用いることが好ましい。より具体的には、被検物質を存在させた場合の顕微鏡写真から測定できる新生された血管の長さの合計が、被検物質が存在しない場合のそれに対して、約90%以下、好ましくは約80%以下、より好ましくは約70%以下となっていれば良い。また、実施例に詳細に記載した血管新生の評価方法において、被検物質を存在させた場合の値が、被検物質が存在しない場合の値に対して、約90%以下、好ましくは約80%以下、より好ましくは約70%以下となっていれば良い。

ここで、上記スクリーニング方法に用いる被検物質としては特に限定されず、タンパク質であってもよいし、低分子化合物であってもよいし、高分子化合物でもよい。また、精製された物質であってもよいし、複数の物質が共存している混合物であってもよい。さらに、微生物の培養液などの自然界由来のものであってもよいし、化学合成によって合成されたものでもよい。また、被検物質は、新規化合物であっても、公知化合物であってもよい。以下のスクリーニング方法においても同様である。

(b) ゴルジ体膜にアンカーリングされている成熟型 G n T - V を切断して、
ゴルジ体膜から遊離させ、分泌型 G n T - V に変換するプロテアーゼの活性を
阻害する化合物は、前記プロテアーゼを用いるスクリーニング方法により容易
5 に得ることができる。前記プロテアーゼを用いるスクリーニング方法としては、
特に限定されず、被検物質の存在下に、前記プロテアーゼをゴルジ体膜にアン
カーリングされている成熟型 G n T - V に作用させることにより生じる分泌型
G n T - V が、被検物質の非存在下におけるそれと比べて少ない場合は、かかる
被検物質は、プロテアーゼの活性を阻害する化合物であるといえる。また、
10 試験管内で前記プロテアーゼの活性を阻害する被検物質をスクリーニングして
もよい。

前記プロテアーゼとしては、例えば β -セクレターゼ (β -secretase) など
が挙げられる。該 β -セクレターゼは、そのアミノ酸配列が Vassar, R., et al.,
Science 286, 735-741 (1999) などに記載されており、また GenBank accession
15 number AF190725 などの情報から、容易に入手することができる。前記プロテア
ーゼとしては、 γ -セクレターゼ (γ -secretase) も挙げられる。 γ -セクレ
ターゼは、アミロイド β -前駆体のアミノ末端が β -セクレターゼによって
切断されて生成する 12 KD のアミロイドタンパク質のゴルジ体膜に結合した
カルボキシル末端側ペプチド断片を、膜貫通部位で切断する (Tsai, J.Y., et
20 al., Curr. Med. Chem. 9, 1087-1106 (2002))。 γ -セクレターゼの実体はまだ
明らかにされていないが、ゴルジ体膜に結合したプレセニリン (presenilin)
と複合体を形成して、アミロイドタンパク質の切断を行うと考えられている
(Wolfe, M.S., Curr. Top. Med. Chem. 2, 371-383 (2002))。該 γ -セクレ
ターゼを発現している細胞は前記文献に記載されている公知の方法により得るこ
25 とができる。例えばプレセニリンを高発現させて γ -セクレターゼ活性を高めた
細胞 (例、PS-1 Δ E9) などを用いることができる。

化合物（b）としては、例えばγ-セクレターゼ阻害作用を有する化合物が挙げられ、かかる化合物はγ-セクレターゼ活性を抑制または阻害する作用を有すれば、いかなる構造をとっていてもよい。γ-セクレターゼ阻害作用を有する化合物としては、下記式（1）；



（式中、BocはBoc基を、OMeはメトキシ基を、Valはバリンを、Ileはイソロイシンを表す。）

で示される化合物が挙げられる。また、かかる化合物の誘導体であっても、γ-セクレターゼ阻害作用を有していれば、本発明の血管新生阻害剤として用いることができる。前記式（1）で示される化合物の誘導体としては、例えば、（a）メチル基をC₂₋₆の低級アルキル基に変換した化合物、（b）バリンのアミノ末端の保護基であるBoc基を他のアミノ基の保護基に変換した化合物、（c）イソロイシンのカルボキシル末端の保護基であるメトキシ基を他のカルボキシル基の保護基に変換した化合物、（d）前記式（1）で示される化合物を還元し、一または二のカルボニル基を-CHOH-基に変換した化合物、（e）一または二のバリンを他のアミノ酸、好ましくはグリシン、アラニン、ロイシンまたはイソロイシンなどの脂肪族アミノ酸に変換した化合物、（f）一または二のイソロイシンを他のアミノ酸、好ましくはグリシン、アラニン、ロイシンまたはバリンなどの脂肪族アミノ酸に変換した化合物、（g）（a）～（f）の変換を2つ以上組み合わせさせた化合物などが挙げられる。

（c）上述の血管新生作用を有するペプチド又はタンパク質の発現を抑制する化合物は、公知の方法により得ることができる。例えば、上述の血管新生作用を有するペプチド又はタンパク質の発現のためのプロモーターと、レポータ

一遺伝子を用いる方法（横田崇、新井賢一著、バイオマニュアルシリーズ4、羊土社(1993)）が挙げられる。すなわち、上述の血管新生作用を有するペプチド又はタンパク質の発現のためのプロモーター、好ましくはG n T-V遺伝子のプロモーターと、レポーター遺伝子とが導入されている形質転換細胞を用いるスクリーニング方法により化合物（c）を得ることができる。より具体的には、上記プロモーターをレポーター遺伝子の翻訳領域に連結して発現ベクターを作製し、前記発現ベクターを宿主細胞に導入して形質転換細胞を作製し、該形質転換細胞を一定時間培養し、その後、被験物質の任意の量を添加し、一定時間後の該細胞が発現するレポーターの量を酵素活性として、又は発現タンパク質の量として測定することによって行うことができる。より具体的には、被検物質の存在下でのレポーター遺伝子の発現量が、被検物質の非存在下でのレポーター遺伝子の発現量に比して少ない場合、かかる被検物質は、上述の血管新生作用を有するペプチド又はタンパク質の発現を抑制する物質であるといえる。

上記方法において、上述の血管新生作用を有するペプチド又はタンパク質の発現のためのプロモーターとしては、G n T-V遺伝子上流のプロモーター領域を用いることが好ましい。かかるプロモーターは、G n T-V遺伝子の5'-上流領域をH u C C-T 1細胞のゲノムからクローニングする（Saito, H., et al., Eur. J. Biochem. 233, 18-26(1995)）ことにより得ることができる。H u C C-T 1細胞は、Japanese Cancer Resources Bank から得ることができる。

また、上記方法において、レポーター遺伝子としては、その発現産物の活性又は生産量（mRNAの生産量も含まれる）を当業者が測定可能なものであれば、いかなるペプチド、タンパク質をコードする遺伝子を用いてもよい。例えば、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ（C A T）、 β -ガラクトシダーゼ（ β -G a l）、ルシフェラーゼ等を酵素活性を測定することで利用

できる。また、分泌型成長ホルモンなどは、免疫抗体反応法などでその生産量を測定することで利用することができる。

上記発現ベクターは、上記プロモーター及びレポーター遺伝子の翻訳領域を、複製可能なベクター中に挿入することによって得ることができる。該複製可能なベクターとしては特に限定されないが、例えば大腸菌内で複製可能なものとして、pUC18又はpGEM-3Zなどが挙げられる。前記発現ベクターを宿主細胞に導入して形質転換細胞を作製する。宿主細胞は、特に限定されず、発現ベクターの種類により適宜選択することができる。また、かかる形質転換は、通常の方法によって行うことができる。また、本発明に用いられる形質転換細胞としては、発現ベクターが安定的（stable）に宿主染色体に組み込まれるものの他、発現ベクターが一時的（transient）に宿主に導入されるものも用いられる。発現ベクターが安定的に宿主染色体に組み込まれた形質転換細胞の選択は、導入したいベクター内に選択マーカー遺伝子を組み込んだベクター、又は、導入したいベクターと同時に選択マーカーを含むベクターで宿主細胞を形質転換し、該選択マーカーを有しているものだけが生存できる培地で該形質転換された細胞を培養することによって行うことができる。

より好ましくは、下記方法により上述の血管新生作用を有するペプチド又はタンパク質の発現を抑制する化合物を得ることができる。すなわち、（a）下記の塩基配列：5' - G G G A G T G A G G A T G A T G T A G G G A A G - 3'（配列番号：8）および5' - A T G G G G C A G A G G A A C T T A C G T T A T - 3'（配列番号：9）の少なくとも一方を含有するDNAと；（b）E t s - 1タンパク質又はその断片と；（c）被検物質とを一緒にインキュベートし、そして前記DNA（a）とE t s - 1タンパク質又はその断片との結合を測定するという方法である。

G n T - V遺伝子の転写は、G n T - V遺伝子上流のプロモーター領域のうち上記配列で示した特定の部位にE t s - 1タンパク質が結合することによ

り促進する。ペプチド又はタンパク質は、少なくともG n T-Vの塩基性アミノ酸クラスター領域を含む。したがって、前記配列のDNAとE t s-1タンパク質又はその断片との結合を阻害する被検物質は、上述の血管新生作用を有するペプチド又はタンパク質の発現を抑制することができる。

- 5 上記配列のDNAとE t s-1タンパク質又はその断片との結合を測定する方法としては、公知の方法を用いてよい。かかる測定方法の好ましい態様としては、ゲルシフトアッセイ及びスーパーシフトアッセイが挙げられ、これらの方法について下記に詳述する。

- ゲルシフトアッセイは、例えば、下記のように行う。[γ - 32 P] d A T P (例
10 えばAmersham社より入手可能)を用いて、上記配列のDNAの5'-延長端をラベルする。得られた 32 PラベルされたDNA(10,000 c p m)と、M O L T 4細胞のインビトロで転写され/翻訳された切断E t s-1タンパク質又は核抽出物を、65 mM K C l、25 mM トリス-HC l (p H 7.9)、6 mM M g C l₂、0.25 mM E D T A及び10%グリセロールを含む
15 緩衝液と共に20 m lの合計体積となるように混合する。ついで、2 μ gのポリ(d I-d C)(例えばS i g m a社より入手可能)を反応混合物に添加する。ついで、反応混合物を室温で1時間培養する。得られた培養液を、6%の非変性ポリアクリルアミドゲル(アクリルアミド:ビスアクリルアミド=29:1)、0.5 \times T B E (1 \times T B E=89 mM トリス、89 mM ホウ酸、2 mM
20 E D T A)上に付加し、そして次に電気泳動を4 $^{\circ}$ C、150 Vで1時間行う。電気泳動の後、ゲルをゲルドライヤーにより乾燥せしめ、そして次にX線フィルム(例えばコダック社より入手可能)に暴露する。

- ゲルシフトアッセイにおいては、上記配列のDNAとE t s-1タンパク質又はその断片との複合体が示す非変性ポリアクリルアミドゲルを用いた電気泳
25 動における移動度が、E t s-1タンパク質又はその断片と結合していない上記配列のDNAが示すそれに比して小さくなる。そこで、上記反応混合物に被

検物質を所望量添加したときに、上記のような操作によって得られる電気泳動の結果において、上記配列のDNAとE t s - 1タンパク質又はその断片との複合体が示すバンドが観察されないか、そのバンドの量が少なくなっていれば、被検化合物は、上記配列のDNAとE t s - 1タンパク質又はその断片との結合を阻害する物質であると判断できる。

スーパーシフトアッセイは、反応混合物に、さらに他のE t s ファミリーのタンパク質と交差反応しない抗-E t s - 1 I g G（例えば Cambridge Research Biochemicals より入手可能）を添加する以外は、ゲルシフトアッセイと全く同様に行う。スーパーシフトアッセイにおいては、上記配列のDNAとE t s - 1タンパク質又はその断片との複合体が示す非変性ポリアクリルアミドゲルを用いた電気泳動における移動度が、E t s - 1タンパク質又はその断片と結合していない上記配列のDNAが示すそれに比して、ゲルシフトアッセイのときよりもさらに小さくなる。そこで、上記反応混合物に被検物質を所望量添加したときに、上記のような操作によって得られる電気泳動の結果において、上記配列のDNAとE t s - 1タンパク質又はその断片との複合体が示すバンドが観察されないか、そのバンドの量が少なくなっていれば、被検化合物は、上記配列のDNAとE t s - 1タンパク質又はその断片との結合を阻害する物質であると判断できる。

(d) 上述の血管新生作用を有するペプチド又はタンパク質がヘパラン硫酸プロテオグリカン (heparan sulfate proteoglycan) に結合するのを抑制する化合物は、上述の血管新生作用を有するペプチド又はタンパク質がヘパラン硫酸プロテオグリカンに結合しないようにする化合物はもちろん、上述の血管新生作用を有するペプチド又はタンパク質と、ヘパラン硫酸プロテオグリカンとの親和性を小さくする化合物であってもよい。上述の血管新生作用を有するペプチド又はタンパク質は、F G F - 2 (fibroblast growth factor-2) と競合

して、細胞表面又は及び細胞外マトリクス上のヘパラン硫酸プロテオグリカンに結合する。さらに、上述の血管新生作用を有するペプチド又はタンパク質のほうが、FGF-2よりもヘパラン硫酸プロテオグリカンとの親和性が高いため、ヘパラン硫酸プロテオグリカンに結合しているFGF-2をヘパラン硫酸
5 プロテオグリカンから解離させる。そのようにして生じた遊離FGF-2が内皮細胞などを刺激して血管新生が起こる。そのため、上述の血管新生作用を有するペプチド又はタンパク質がヘパラン硫酸プロテオグリカンに結合しないようにするか、又はヘパラン硫酸プロテオグリカンとの親和性を小さくする化合物が存在すれば、FGF-2は優位にヘパラン硫酸プロテオグリカンに結合す
10 ることができ、上述のような血管新生の過程が進行しない。

上述の血管新生作用を有するペプチド又はタンパク質がヘパラン硫酸プロテオグリカンに結合するのを抑制する化合物としては、例えば、かかるペプチド又はタンパク質が有する塩基性アミノ酸クラスター領域をブロックする化合物などが挙げられる。かかる化合物としては、具体的には、例えば、酸性アミノ
15 酸を多く含む酸性アミノ酸クラスター領域を含むペプチド又はタンパク質が挙げられる。前記酸性アミノ酸クラスター領域としては、アミノ酸の総数が5～50程度、好ましくは8～40程度、より好ましくは10～30程度の酸性アミノ酸を多く含む部分が好ましい。前記酸性クラスター領域においては、酸性アミノ酸の数が前記領域の全アミノ酸数のうちの約30%以上、好ましくは約
20 35～95%程度、より好ましくは約40～90%程度を占めていることが好ましい。化合物(d)としては、GnT-Vがヘパラン硫酸プロテオグリカンに結合するのを抑制する化合物が好ましい。

(e) 上述の血管新生作用を有するペプチド又はタンパク質が細胞外に分泌
25 されるのを阻害する化合物は、細胞内で発現した血管新生作用を有するペプチド又はタンパク質を細胞外に分泌することができる細胞を用いたスクリーニン

グ方法により容易に得ることができる。具体的には、前記細胞を被検物質の存在下に培養し、培養液中に分泌された血管新生作用を有するペプチド又はタンパク質の量を測定するというスクリーニング方法が挙げられる。かかるスクリーニング法で、血管新生作用を有するペプチド又はタンパク質の量が減少していれば、被検物質は血管新生阻害剤となり得る。

「細胞内で発現した血管新生作用を有するペプチド又はタンパク質を細胞外に分泌することができる細胞」としては、例えばヒト大腸癌細胞株WiDrなどの血管新生作用を有するペプチド又はタンパク質、好ましくは分泌型GnT-Vを分泌する細胞であればよい。特に、血管新生作用を有するペプチド又はタンパク質、好ましくはGnT-Vの一部又は全部をコードする遺伝子が導入された形質転換細胞であって、野生型細胞に比べて血管新生作用を有するペプチド又はタンパク質、好ましくは分泌型GnT-Vを高発現することができる細胞が好ましい。かかる細胞として、例えば、膀胱癌細胞MIA PaCa-2にGnT-V遺伝子を導入してGnT-Vを高発現された細胞（PaCa-2/GnT-V細胞）または口腔癌細胞KBにGnT-V遺伝子を導入してGnT-Vを高発現させた細胞（KB/GnT-V細胞）などが挙げられる。

培養液中に分泌された血管新生作用を有するペプチド又はタンパク質は、例えばゲル電気泳動などを用いて直接その量を測定することができる。また、培養液中の当該ペプチド又はタンパク質の活性、例えば β 1, 6-N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ活性を測定することによっても、間接的に培養液中に分泌された血管新生作用を有するペプチド又はタンパク質の量を測定することができる。

本発明に係る血管新生阻害剤は、活性成分である上記（a）～（e）の化合物のうちの少なくとも1種類の化合物そのものであってもよいが、通常、該活性成分と薬理学的に許容される担体を自体公知の方法〔製剤技術分野において

慣用の方法、例えば日本薬局方（例えば第 13 改正）に記載の方法等] にしたがって混合することによって製造される。ここで、薬学的に許容される担体としては、上述の血管新生促進剤と同一のものが挙げられる。本発明に係る血管新生阻害剤の剤形としては、上述の血管新生促進剤の剤形と同一の剤形を例示
5 でき、なかでも、本発明に係る血管新生阻害剤は、非経口剤とするのが好ましい。

本発明に係る血管新生阻害剤は、哺乳動物（例、ヒト、マウス、ラット、ウサギ、イヌ、ネコ、ウシ、ウマ、ブタ、サル等）に対して用いることができ、その投与量は、血管新生阻害剤の有効成分の種類、治療すべき病態の種類、患者の年齢及び体重、症状及び疾患の重篤度などにより異なるので、一概には言
10 えない。

本発明に係る血管新生阻害剤の用途は特に限定されないが、血管新生を伴う種々の疾患、例えば腫瘍（例、悪性黒色腫、悪性リンパ腫、消化器（例、胃、腸など）癌、肺癌、膵臓癌、食道癌、乳癌、肝臓癌、卵巣癌、子宮癌、前立腺
15 癌、腎癌、膀胱癌、脳腫瘍、カポジ肉腫、血管腫、骨肉腫、筋肉腫、血管線維腫など）、炎症性疾患（例、関節リウマチ、乾癬など）、糖尿病網膜症、アテローム性動脈硬化症（アテローム性動脈硬化巣外膜の異常毛細血管網形成における異常な脈管形成を含む）などの予防・治療剤として用いられる。また、本発明の血管新生阻害剤は、目の充血の治療剤としても用いることができる。

本発明の血管新生阻害剤において、上記（a）～（e）の化合物の血管新生阻害作用に悪影響を及ぼさない併用薬剤を用いることができる。このような併用薬剤としては、例えば抗腫瘍薬、悪液質改善薬、インスリン抵抗性改善薬以外の糖尿病治療薬、糖尿病合併症治療薬、抗肥満薬、高血圧治療薬、高脂血症治療薬、利尿剤などが挙げられ、2 種類以上を組み合わせてもよい。また、本
25 発明の血管新生阻害剤を用いる際に、外科療法（手術）あるいは放射線療法を行ってもよい。

本発明に係る血管新生阻害剤及び併用薬剤の投与時期、併用薬剤の投与量および併用薬剤の投与形態などについては、上述した血管新生促進剤の場合と同一である。

5 実施例

以下に、実施例によって本発明を詳細に説明するが、本発明はこの実施例に限定されるものではない。

〔実施例 1 GnT-V 形質転換細胞の転移によるヌードマウスの血管新生の促進〕

GnT-V の発現が大腸癌の転移と予後の悪化に高い相関性を示すことから、ヒト大腸癌細胞 WiDr を用いて、GnT-V の安定な形質転換細胞とともに、コントロールとして β 1, 4-N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ-III (GnT-III ; β 1, 4-N-acetylglucosaminyltransferase-III) 及び α 1, 6-フコシルトランスフェラーゼ (FucT ; α 1, 6-fucosyltransferase) の形質転換細胞を作成し、ヌードマウスの皮下に注射して癌転移に及ぼす影響を調べた。ヒト大腸癌細胞株 WiDr を 10% の子ウシ血清 (FBS ; fetal bovine serum) 及び抗生物質 (ペニシリン及びストレプトマイシン) を含む RPMI-1640 培地 (GIBCO BRL. 社製) で培養した。形質転換は、CELL FECTIN (登録商標) 試薬 (GIBCO BRL. 社製) を用いて行い、形質転換の方法は CELL FECTIN (登録商標) の説明書に従って行った。上記形質転換された癌細胞のヌードマウスへの移植は、上記それぞれの糖転移酵素で形質転換した 5×10^5 の細胞をヌードマウスの背中に注射し、1 ヶ月後に癌の形成と血管新生を肉眼的に観察した。WiDr 細胞はもともと上記の糖転移酵素をわずかししか発現していないが、GnT-V 形質転換細胞を移植したヌードマウスには、他の糖転移酵素遺伝子で形質転換した WiDr 細胞を移植したヌードマウスに比較して、癌転移の促進が認められ、腫瘍組織において著しい血管新生が認められた。この結果は、GnT-V を過剰発現している癌細胞では、血管新生を促進する何らかの因子を分泌していることを示唆している。

〔実施例2 GnT-V 形質転換細胞による血管新生の誘導〕

GnT-V 形質転換細胞による血管新生促進を、ニワトリ受精卵の胚を用いた CAM (chorioallantoic membrane) アッセイによって確認した。CAM アッセイは、Yen
5 らの方法 (Yen, L., et al., Oncogene 19, 3460-3469 (2000)) 及び Bernardini
の方法 (Bernardini, G., et al., Blood 96, 4039-4045 (2000)) を若干改良し
て行った。白色レグホンの受精後 8 日の CAM を用い、 1×10^5 の細胞をコラー
ゲンスポンジの上に植え、4 時間保持した。コラーゲンスポンジ上の CAM の上
に 5 mm のシリコンリングを置き、48 時間保持した。実施例 1 に記載の糖転移
10 酵素遺伝子で形質転換した WiDr 細胞の中で、GnT-V 形質転換細胞にだけコラー
ゲンスポンジ中への血管の侵入が増加していることが認められた。また、WiDr
細胞及び COS-1 細胞や CHO 細胞のような非癌性細胞に GnT-V 遺伝子を一過性に
形質転換した細胞においても、上記 GnT-V の安定な形質転換細胞と同様に CAM
アッセイによって血管新生の促進が認められた。これらの結果は、GnT-V の発現
15 によって血管新生が促進されるのに共通の機構が存在することを強く示唆して
いる。

〔実施例3 GnT-V 形質転換細胞の培養液による血管新生の誘導〕

GnT-V 形質転換細胞による血管新生の誘導を試験管内で評価するために、
20 Soker らの方法 (Soker, S., et al., J. Biol. Chem. 272, 31582-31588 (1997))
によって GnT-V 形質転換細胞の培養液で刺激した後のヒト臍帯静脈上皮細胞
(HUVEC; human umbilical vein epithelial cell) の DNA 合成量を測定した。
タイプ I コラーゲンでコーティングした 96 穴プレートに、HUVEC をウェルあた
り 2×10^3 細胞になるように植え、24 時間後に、培地を 0.1% 子ウシ血清アル
25 ブミンを含む MCDB131 培地 (FBS と FGF-2 を含まない) に交換し、24 時間飢餓
状態にした。培地を、実施例 1 に記載の糖転移酵素遺伝子で形質転換した WiDr

細胞の培養液と交換し、24時間 HUVEC を刺激した。HUVEC を [^3H] -チミジン ([^3H]-thymidine) ($1\ \mu\text{Ci/ml}$) とともに8時間保持し、[^3H] -チミジンの HUVEC への取り込みを、MicroBeta-Counter (Wallac 社製)で分析して、DNA 合成量を測定した。結果は6ウェルのアッセイの結果の平均値で示し、標準偏差を測定した。全ての実験は少なくとも3回繰り返し、同じ結果が得られた。第1図から明らかなように、GnT-V 遺伝子で形質転換した WiDr 細胞の培養液で刺激された HUVEC の DNA 合成は増加したが、他の糖転移酵素遺伝子で形質転換した WiDr 細胞の培養液では同様の効果は認められなかった。これらの結果は、GnT-V 遺伝子で形質転換した WiDr 細胞が GnT-V の過剰発現に由来する血管新生因子を培養液中に分泌していることを示している。

〔実施例4 組換え GnT-V の HUVEC の分化・増殖に及ぼす影響〕

GnT-V 遺伝子で形質転換した WiDr 細胞の培養液中に存在する血管新生因子の精製を、各種カラムクロマトグラフィーを用いて行った。各画分の血管新生活性は、実施例3に記載した HUVEC の分化・増殖で評価した。ヘパリン・アフィニティークロマトグラフィーにおいて、HUVEC の増殖活性が高い画分が 0.3 M NaCl で溶出した。この性質は、FGF-1、FGF-2、VEGF、胎盤由来増殖因子 (PlGF) 及び肝細胞増殖因子 (HGF) などの公知の増殖因子が 0.8-1.5 M NaCl で溶出されるので (Hauser, S. & Weich H.A., Growth Factor 9, 259-268 (1993). Gohda, E., et al., J. Clin. Invest. 81, 414-419 (1998). Marez, A., et al., Biochimie 69, 125-129 (1987). Risau, W., et al., The EMBO J. 7, 959-962 (1988). Rothenthal, R.A., et al., Growth Factor 4, 53-59 (1990)), これら公知の増殖因子の性質と全く異なる。WiDr 細胞自身はこのような血管新生因子を産生しない。ヘパリン・アフィニティークロマトグラフィーにおいて 0.3 M NaCl で溶出される画分を、抗 GnT-V 抗体を用いたウェスタンブロット分析を行ったところ、抗 GnT-V 抗体の反応と HUVEC の分化・増殖活性が一致し、当該画

分に存在する HUVEC の分化・増殖活性を有する主要なタンパク質が GnT-V そのものであることを確認した。

GnT-V は、他の糖転移酵素 (Gu, J., et al., J. Biochem. 113, 614-619 (1993). MaCaffery, G. & Jamison, J.C., Comp. Biochem. Physiol. B. 104, 91-94 (1993).
5 Ugarte, M.A. & Rodriguez, P., J. Biochem. 23, 719-726 (1991)) と同様、GnT-V は癌細胞から分泌されること (Chen, L., et al., Glycoconjugate J. 12, 813-823 (1995)) が知られているが、それらの糖転移酵素の分泌の生理学的意義については知られていない。分泌型 GnT-V 自身が HUVEC の分化・増殖を誘導するという仮説を実証するために、膜貫通部分を欠くが糖転移酵素活性は保持
10 されている GnT-V Δ 73 という組換え GnT-V を作成した。組換え GnT-V で可溶性の GnT-V Δ 73 は、Sasai らの文献 (Sasai, K., et al., Glycobiology (in press)) に開示された方法に従い、パキューロウィルスのシステムで調製した。第 2 図に示すように、GnT-V Δ 73 の組換え GnT-V を添加することにより、HUVEC の分化・増殖が添加量依存的に増加した。用いた GnT-V Δ 73 の濃度は生理的範囲にあり、
15 GnT-V 形質転換細胞の培養液中に存在する GnT-V は、GnT-V Δ 73 の比活性を基準にすると、140 ng/ml になった。さらに、B16-F10 のマウスメラノーマ細胞は高い内在性の GnT-V 活性があり、B16-F10 細胞の培養液は 70 ng/ml の GnT-V を含有しており、B16-F10 細胞も CAM アッセイで同様の血管新生活性を示した。また、組換え Fuc-T の添加は、いかなる HUVEC 増殖促進活性も示さなかった。これら
20 の結果は、生理的濃度範囲内の分泌型 GnT-V が HUVEC の増殖促進活性を有していることを示している。

[実施例 5 HUVEC の分化・増殖に関与する GnT-V のドメイン解析]

GnT-V のどのドメインが HUVEC の増殖促進活性に関与するかを明らかにするために、第 3 図 A に示した GnT-V の欠失変異体を作成した。GnT-V Δ 188 プラスミドの作成法は Sasai らの文献 (Sasai, K., et al., Glycobiology (in press))
25

に開示されている。GnT-V Δ 233 遺伝子をもつトランスファープラスミドは、GnT-V Δ 188 プラスミドを EcoRI 及び EagI で切断して得られる、ヒト GnT-V の Glu234 から Leu741 及びC末端のポリヒスチジンタグをコードする 1521 塩基対の DNA 断片を、トランスファーベクターpAcGP67-A(PharMingen 社)の EcoRI-EagI サイトに結合して作成した。GnT-V Δ 436 遺伝子をもつトランスファープラスミドは、GnT-V Δ 188 プラスミドを EcoRV 及び EagI で切断して得られる、ヒト GnT-V の Ile437 から Leu741 及びC末端のポリヒスチジンタグをコードする 912 塩基対の DNA 断片を、トランスファーベクターpAcGP67-A の EcoRV-EagI サイトに結合して作成した。組換えバキュロウィルスを作成するために、文献公知の方法 (Ikeda, Y., et al., J. Biochem. 128, 609-619 (2000)) に従って、上記で得られたトランスファープラスミドで昆虫細胞 Sf21 を形質転換した。形質転換した Sf21 細胞に由来する組換え糖転移酵素は、Sasai らの文献 (Sasai, K., et al., Glycobiology (in press)) に開示された方法に従い、Ni²⁺-キレートアフィニティークロマトグラフィーで精製した。

第3図Bに示すように、GnT-V Δ 73、GnT-V Δ 188 及び GnT-V Δ 233 の変異体は HUVEC の増殖・分化亢進作用を有していたが、GnT-V Δ 436 は HUVEC の増殖・分化亢進作用がなかった。GnT-V Δ 73 及びGnT-V Δ 188は糖転移酵素活性があるが、GnT-V Δ 233 及び GnT-V Δ 436 には糖転移酵素活性はなかった。これらの結果は、HUVEC の増殖促進活性がGnT-V の 234 番目から 436 番目までのアミノ酸配列に対応する領域に存在し、この領域は糖転移酵素活性に関わる領域を含まないことを示唆している。

〔実施例6 血管新生を誘導する GnT-V の塩基性アミノ酸クラスター領域の同定〕

ヒト GnT-V の 254 番目から 269 番目までのアミノ酸配列は、塩基性アミノ酸がクラスターになった、Lys-Ser-Val-Arg-Gly-Lys-Gly-Lys-Gly-Gln-Lys-Arg-

Lys-Arg-Lys-Lys の配列（配列番号 7）であり、この配列に非常に似た配列が VEGF₁₈₉ (Hauser, S. & Weich H.A., Growth Factor 9, 259-268(1993)) の 142 から 157 番目のアミノ酸配列に認められる（第 4 図参照）。このアミノ酸クラスター領域は、PIGF-2 及びヘパリン結合型表皮増殖因子様増殖因子（HB-FGF）にも保存されており（第 4 図参照）、ヘパリン結合モチーフとして働いている（Hauser, S. & Weich, H.A., Growth Factor 9, 259-268 (1993)）。Barillari らは、PIGF-2 由来の Gly-Arg-Gly-Lys-Arg-Arg（配列番号 10）の配列を持つ塩基性ペプチドが、細胞表層及び／又は細胞外マトリックス上のヘパラン硫酸プロテオグリカン（HSPG）から FGF-2 を遊離することにより、表皮細胞の増殖を誘導することを報告している（Barillari, G., et al., American J. Patho. 152, 1161-1166 (1998)）。

GnT-V の、264 番目から 269 番目のアミノ酸配列である Lys-Arg-Lys-Arg-Lys-Lys（配列番号 11）からなる塩基性ペプチド（KRKRKK ペプチド）、及び 291 番目から 296 番目のアミノ酸配列である Phe-Ser-Gly-Gly-Pro-Leu（配列番号 12）からなる非塩基性のコントロールペプチド（FSGGPL ペプチド）を合成し、これらのペプチドの HUVEC の増殖に及ぼす影響を調べた。ペプチドの合成はペプチド合成機 A432（Applied Biosystems 社製）で合成し、逆相 HPLC で精製した後、分子量と精製度を MALDI TOF-MS（Voyager-DE（登録商標） RP; PerSeptive Biosystems 社製）で確認した。FGF-2 の濃度は公知の方法（Barillari, G., et al., American J. Patho. 152, 1161-1166 (1998)）で測定した。すなわち、ウェルあたり 5×10^4 細胞の HUVEC をコラーゲンでコートした 12 穴プレートに植え、PBS で 2 回洗浄後、培地を MCDB131/0.1% BSA (0.5 ml/well) に交換し、ヘパリンと共に、GnT-V Δ 73、GnT-V Δ 436、KRKRKK ペプチドもしくは FSGGPL ペプチドの存在又は非存在下、4℃で 2 時間プレート回転台で保持した。4℃、3000 rpm、5 分の遠心後、上清を回収し、上清中の FGF-2 濃度を FGF-2 ELISA システム（R&D Systems 社製）で、当該システムの説明書に従って測定した。

上述のように、HUVEC の培養液に GnT-V の各種欠失変異体及び合成ペプチドを 4℃で添加し、HUVEC 上の HSPG から遊離する FGF-2 の量を測定した結果、第 5 図に示すように、GnT-V Δ 73 及び KRKRKK ペプチドは FGF-2 を遊離したが、GnT-V Δ 436 及び FSGGPL ペプチドは FGF-2 の遊離に影響しなかった。GnT-V Δ 73 と同様に、GnT-V Δ 188 及び GnT-V Δ 233 も FGF-2 を遊離した。同様に、HSPG 結合分子のヘパリン結合サイトと競合することによって当該 HSPG 結合分子を遊離することが知られているヘパリン (Biard, A., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 2324-2328 (1988)) は、FGF-2 の遊離を誘導した。遊離した FGF-2 の刺激による HUVEC 上の FGF レセプターのリン酸化も確認した。第 6 図に示すように、KRKRKK ペプチドは、GnT-V Δ 73 と同程度に HUVEC の増殖を促進したが、この効果は同時に添加した抗 FGF-2 中和抗体によって完全に抑制された。これらの結果は、GnT-V の塩基性アミノ酸クラスター領域は HUVEC 増殖促進活性に十分であり、GnT-V タンパク質は当該タンパク質の塩基性部分の作用によって、内皮細胞上の HSPG から FGF-2 を遊離することにより血管新生を促進することを示唆している。

[実施例 7 GnT-V タンパク質による in vivo での血管新生]

GnT-V による血管新生の誘導は、HUVEC を用いた、キャピラリー様チューブ形成アッセイ (Ashoton, A.W., et al., J. Biol. Chem. 274, 35562-35570 (1999)) 及びマイグレーションアッセイ (Zeng, H., et al., J. Biol. Chem. 276, 3271-3279 (2001)) のような他の in vitro の血管新生アッセイによっても確認された。GnT-V の血管新生活性を生体外 (ex-vivo) で確認するために、GnT-V Δ 73 タンパク質を用いた CAM アッセイを行った。GnT-V Δ 73 は、FGF-2 と同様にニワトリのマイクロベッセルの血管新生を誘導し、さらに KRKRKK ペプチドも同様に血管新生を誘導したが、GnT-V Δ 73 及び KRKRKK ペプチドによる血管新生の誘導は抗 FGF-2 中和抗体による処理によって阻害された。これに対して、GnT-V Δ 436 及び FSGGPL ペプチドは血管新生活性を持っていなかった。これらの

結果は、分泌型 GnT-V 及び GnT-V 由来の KRKRKK ペプチドは FGF-2 の作用を介した血管新生を誘導するが、HUVEC の分化・増殖アッセイの結果を考慮すれば、GnT-V の塩基性領域は内皮細胞上の HSPG からの FGF-2 の遊離をもたらす。

5 [実施例 8 成熟型 GnT-V タンパク質の切断箇所の解析]

第 8 図に示すように、成熟型 GnT-V は、アミノ末端側に疎水性アミノ酸からなる膜貫入部位を有していることから、細胞内オルガネラであるゴルジ体の膜にアミノ末端側がアンカーリングし、ゴルジ体の内腔側に糖転移酵素活性に
10 関与する触媒部位が存在していると考えられている。成熟型 GnT-V はゴルジ体内腔側で切断を受けて分泌型 GnT-V に変換され、分泌経路に乗って細胞外に分泌されるものと推定されるので、細胞外に分泌された分泌型 GnT-V のアミノ末端のアミノ酸配列を決定して、切断箇所を解析した。

膀胱癌細胞 MIA PaCa-2 に GnT-V 遺伝子を導入して、GnT-V を高発現させた細胞 (PaCa-2/GnT-V) を培養し、1500 ml の無血清培養液を得た。細胞の形質転換及
15 び形質転換細胞の培養は、実施例 1 に記載した方法に従った。この培養液を飽和硫酸で沈澱させ、回収した硫酸沈殿物を 10 ml の PBS (リン酸緩衝サリン) に溶解して、PD-10 カラム (Code Number: 17-0851-01, Amersham Pharmacia Biotech) で脱塩すると同時に、50mM Tris-HCl (pH7.5) へ緩衝液を置換した。続いて、「タンパク質・酵素の基礎実験法 改訂第 2 版 (堀尾武一編集
20 南江堂発行 1994 年)」および「Method in Enzymology vol.182 published by ACADEMIC PRESS, INC. 1990」に記載の公知方法に従って作製した GnT-V のマウスモノクローナル抗体 24D11 をリガンドとするアフィニティークロマトグラフィーで精製した。

Protein A Sepharose 4B を担体とするカラムを 50mM Tris-HCl (pH7.5) で平衡
25 化して分泌型 GnT-V をカラムに吸着させた後、0.05% TFA (トリフルオロ酢酸) を含む 50mM Tris-HCl (pH7.5) で分泌型 GnT-V を溶出した。溶出画分を SDS-ポ

リアクリルアミドゲル電気泳動で分画したところ、およそ100kDの分泌型GnT-Vの分子量に相当する部分にメインバンドが認められた。

ゲルから抽出した分泌型GnT-Vのアミノ末端のアミノ酸配列を文献公知の方法で決定した。その結果、第8図に示すように、分泌型GnT-Vのアミノ末端の配列はHis-Phe-Thr-Ile-Gln-（配列番号：13）と決定されたが、このアミノ酸配列は配列番号6に記載したGnT-Vのアミノ酸配列中の31～35番目までのアミノ酸配列と一致したので、分泌型GnT-Vは成熟型GnT-Vの30番目のロイシンと31番目のヒスチジンの間が切断されて生成することがわかった。

10 〔実施例9 分泌型GnT-Vの生成に関与するプロテアーゼの同定と分泌型GnT-Vの生成を阻害する物質のスクリーニング〕

実施例8で解析した分泌型GnT-Vの切断箇所は、第8図に示したGnT-Vの膜貫入部位とゴルジ体内腔部位の境界にあることから、切断に関与するプロテアーゼとして、ゴルジ体膜に結合した γ -セクレターゼ（ γ -secretase）が想定
15 された。

変異プレセニリン-1を高発現させた、 γ -セクレターゼ活性が高く内因性GnT-Vの発現が強い神経細胞SK-N-SHを用い、この細胞を実施例1に示した方法で培養し、分泌型GnT-Vの産生に及ぼす γ -セクレターゼの影響を調べた。培養液中のGnT-Vの分泌量は、培養液を10倍に濃縮し、特開平6-19
20 7756号公報に記載の方法に従いHPLCを用いて酵素活性を測定することにより定量した。

第9図Aに示すように、変異プレセニリン-1を高発現させた細胞（PS-1 Δ E9）での培養液中のGnT-V活性は変異プレセニリン-1を高発現させていない細胞（コントロール）の約4倍となり、 γ -セクレターゼが成熟型GnT-Vを切断して分泌型GnT-Vを生成することが確認された。また、第9図Bに示すように、
25 変異プレセニリン-1を高発現させた細胞（PS-1 Δ E9）での培養液中（細胞外）

と細胞内の GnT-V 活性の比は約 3.5 であり、変異プレセニリン-1 を高発現させていない細胞（コントロール）での同比約 1.2 よりも約 3 倍高くなり、 γ -セクレターゼ活性の高発現により分泌型 GnT-V の生成及び分泌が促進されることが確認できた。

- 5 γ -セクレターゼの阻害剤として知られている D F K 1 6 7 (J. Med. Chem., 41, 6-9 (1998)) の分泌型 GnT-V 産生に及ぼす影響を調べた。なお、D F K 1 6 7 は上記式 (1) で示される化合物であり、I C N 社 (米国オハイオ州) から入手可能である。膀胱癌細胞 MIA PaCa-2 及び口腔癌細胞 K B に GnT-V 遺伝子を導入して GnT-V を高発現させた細胞を実施例 1 に示した方法で培養して、培養
- 10 液中の GnT-V の活性を測定した。第 10 図 A に示したように、P B S を添加したコントロールに対して、D M S O (ジメチルスルフォオキシド) を添加した PaCa-2/GnT-V 細胞の培養液中の GnT-V 活性は少し低下した。第 10 図 A 及び B に示したように、D M S O に溶解した D F K 1 6 7 を 1 0 0 μ M になるように添加した PaCa-2/GnT-V 細胞及び K B/GnT-V 細胞培養液中の GnT-V 活性は検出
- 15 できなかった。このことは、 γ -セクレターゼ阻害剤である D F K 1 6 7 によって、GnT-V の切断及び分泌型 GnT-V の分泌が完全に阻害されたことを示している。従って、D F K 1 6 7 のような γ -セクレターゼ阻害剤は本発明の 1 つである血管新生阻害剤であること、及び上記実施例で示した GnT-V を高発現させた細胞を用いたスクリーニング方法も、本発明の 1 つである血管新生阻害剤の
- 20 スクリーニング方法として実施可能であることを示している。

産業上の利用可能性

- 本発明は、血管新生作用を有するペプチド又はタンパク質、及びそれを含有する血管新生促進剤を提供する。かかる血管新生促進剤は、創傷治癒、又は動
- 25 脈硬化もしくは血栓、血瘤、血管閉塞に関連する病気の予防及び／もしくは治療に有効である。

また、本発明は、膜に貫通している成熟型G n T－Vが分泌型G n T－Vに変換されるのを抑制することによって、血管新生作用を抑制することができる。

また、G n T－Vの発現を抑制したり、分泌型G n T－Vがヘパラン硫酸プロテオグリカンに結合するのを抑制したりすることによっても、血管新生作用を
5 抑制することができる。このような血管新生作用を抑制する物質は、癌の転移などをはじめとする血管新生が原因となる疾患の予防及び／又は治療に有効である。

さらに、前記G n T－Vの塩基性アミノ酸クラスター領域を含むペプチド及びタンパク質に対する抗体を用いることにより、被検物質中の前記ペプチド及
10 びタンパク質の有無又は量を測定することができ、例えば癌転移の可能性などを知ることができる。

請 求 の 範 囲

1. 血管新生作用を有し、 β 1, 6-N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼの塩基性アミノ酸クラスター領域を含むペプチド又はタンパク質。

5

2. β 1, 6-N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼが、下記性質；

(1) 作用：UDP-N-アセチルグルコサミンをドナー基質としてN-アセチルグルコサミンを α -6-D-マンノシドに転移させ；

10 (2) 基質特異性：GnGn-bi-PAを受容体とした時の基質特異性を100%とした場合、GnGnF-bi-PAを受容体とした時の基質特異性が約78%、GnGnGn-tri-PAを受容体とした時の基質特異性が約125%、GnM-PAを受容体とした時の基質特異性が約66%であり；

(3) 至適pH：6.2-6.3；

15 (4) 活性：活性の発現に Mn^{2+} を必要とせず、また、20mM EDTA存在下においても活性は阻害されず；

(5) 分子量：約73,000（還元剤非存在下SDS-PAGEによる）並びに約73,000及び約60,000（還元剤存在下SDS-PAGEによる）；

20 (6) Km値：受容体GnGn-bi-PA及び供与体UDP-GlcNAcに対するKm値は、各々133 μ M及び3.5mMであり；

(7) 以下のペプチドフラグメントを有する：

(a) Thr-Pro-Trp-Gly-Lys、

(b) Asn-Ile-Pro-Ser-Tyr-Val、

25 (c) Val-Leu-Asp-Ser-Phe-Gly-Thr-Glu-Pro-Glu-Phe-Asn-His-Ala-Asn-Tyr-Ala、

(d) Asp-Leu-Gln-Phe-Leu-Leu、及び

(e) Asn-Thr-Asp-Phe-Phe-Ile-Gly

を有することを特徴とする請求の範囲第1項に記載のペプチド又はタンパク質。

5 3. β 1, 6-N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼが、少なくとも配列番号：6で示されるアミノ酸配列を含んで成るアミノ酸配列、又はこのアミノ酸配列において1又は複数のアミノ酸が修飾されているアミノ酸配列を有することを特徴とする請求の範囲第1項に記載のペプチド又はタンパク質。

10

4. 塩基性アミノ酸クラスター領域において、塩基性アミノ酸の数が前記領域の全アミノ酸数のうちの30%以上を占めることを特徴とする請求の範囲第1項に記載のペプチド又はタンパク質。

15 5. 塩基性アミノ酸クラスター領域が、少なくとも配列番号：7で示されるアミノ酸配列、又はこのアミノ酸配列において1又は複数のアミノ酸が修飾されているアミノ酸配列を含んでいることを特徴とする請求の範囲第1項に記載のペプチド又はタンパク質。

20 6. 請求の範囲第1～5項に記載のペプチド又はタンパク質を含有することを特徴とする血管新生促進剤。

7. 創傷治癒剤、又は動脈硬化の予防及び／もしくは治療剤である請求の範囲第6項に記載の血管新生促進剤。

25

8. 請求の範囲第1～5項に記載のペプチド又はタンパク質を用いること

を特徴とする血管新生阻害剤のスクリーニング方法。

9. 細胞内で発現した請求の範囲第1～5項に記載のペプチド又はタンパク質を細胞外に分泌することができる細胞を用いることを特徴とする血管新生阻害剤のスクリーニング方法。

10. 細胞が、請求の範囲第1～5項に記載のペプチド又はタンパク質を細胞内で高発現できる細胞であることを特徴とする請求の範囲第9項に記載のスクリーニング方法。

11. ゴルジ体膜にアンカーリングされている成熟型 β 1,6-N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼを切断して分泌型 β 1,6-N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼに変換するプロテアーゼを用いることを特徴とする血管新生阻害剤のスクリーニング方法。

12. プロテアーゼが、 β -セクレターゼであることを特徴とする請求の範囲第11項に記載のスクリーニング方法。

13. プロテアーゼが、 γ -セクレターゼであることを特徴とする請求の範囲第11項に記載のスクリーニング方法。

14. 請求の範囲第8～13項に記載のスクリーニング方法において血管新生阻害作用を示す化合物。

15. 請求の範囲第1～5項に記載のペプチド又はタンパク質の発現を抑制することを特徴とする血管新生阻害作用を示す化合物。

16. 請求の範囲第1～5項に記載のペプチド又はタンパク質がヘパラン硫酸プロテオグリカンに結合するのを抑制することを特徴とする血管新生阻害作用を示す化合物。

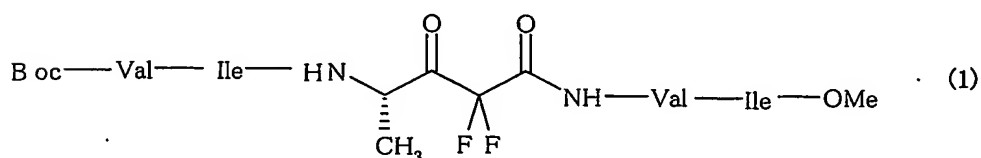
5

17. 請求の範囲第14～16項に記載の化合物を含有することを特徴とする血管新生阻害剤。

18. γ -セクレターゼ阻害作用を有する化合物を含有することを特徴とする血管新生阻害剤。

10

19. γ -セクレターゼ阻害作用を有する化合物が、下記式(1)；



(式中、BocはBoc基を、OMeはメトキシ基を、Valはバリンを、Ileはイソロイシンを表す。)

15

で示される化合物であることを特徴とする請求の範囲第18項に記載の血管新生阻害剤。

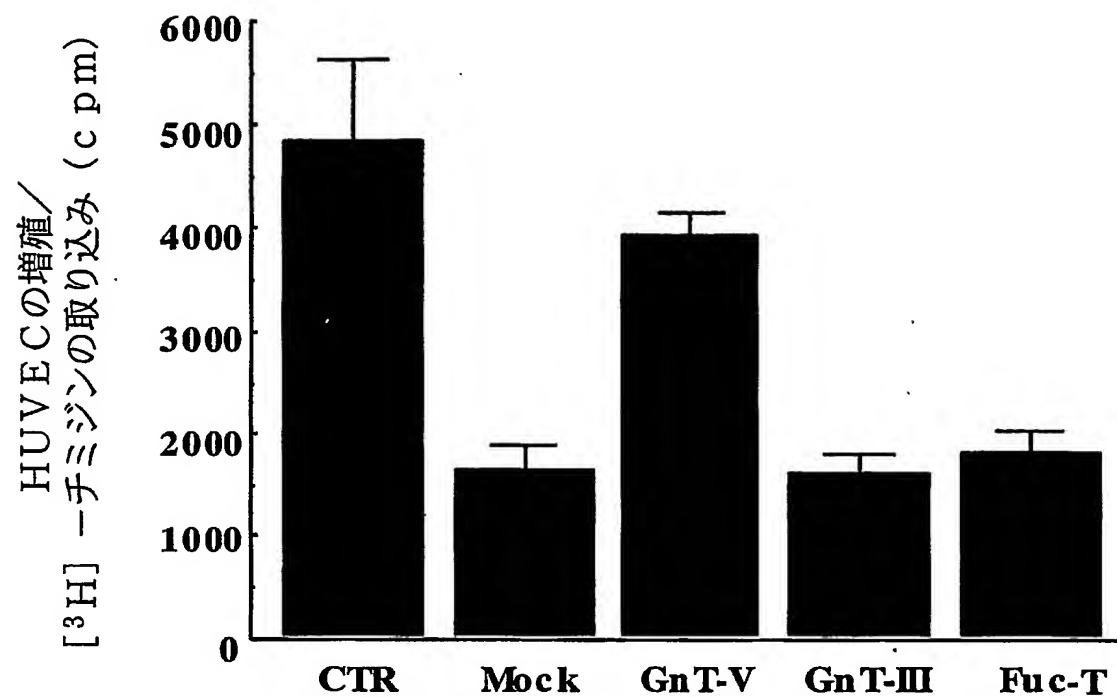
20. 請求の範囲第1～5項に記載のペプチド又はタンパク質に対する抗体。

20

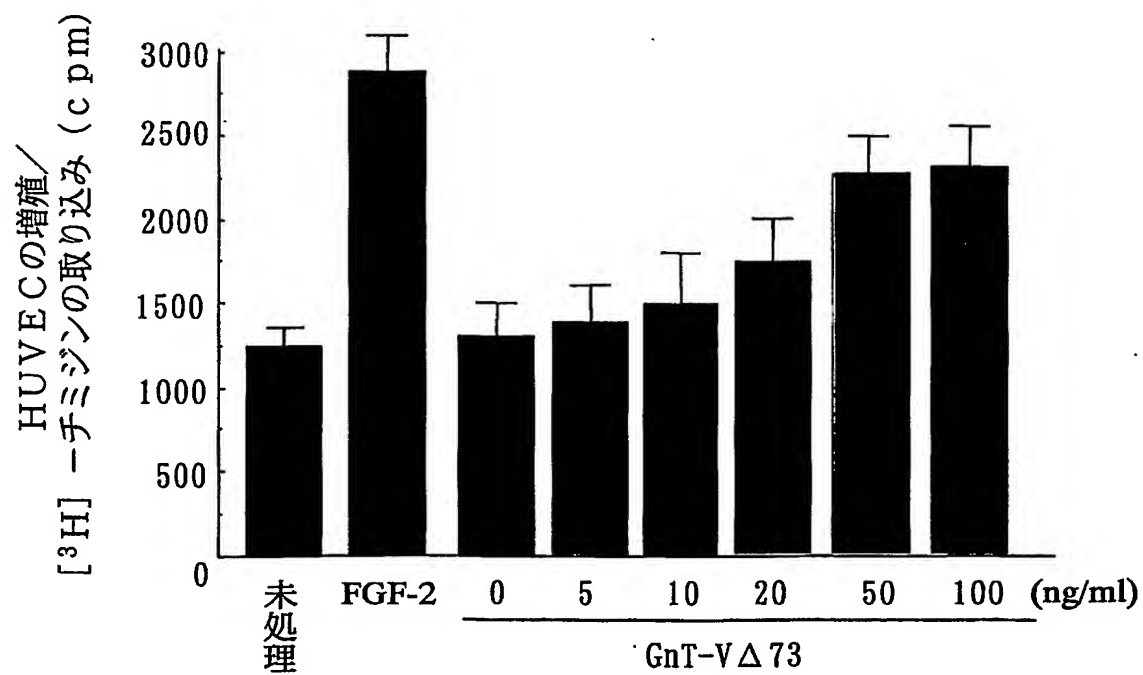
21. 請求の範囲第20項に記載の抗体を用いることを特徴とする請求の範囲第1～5項に記載のペプチド又はタンパク質のアッセイ方法。

22. 請求の範囲第20項に記載の抗体を含むことを特徴とする請求の範囲第1～5項に記載のペプチド又はタンパク質の検出キット。

第1図

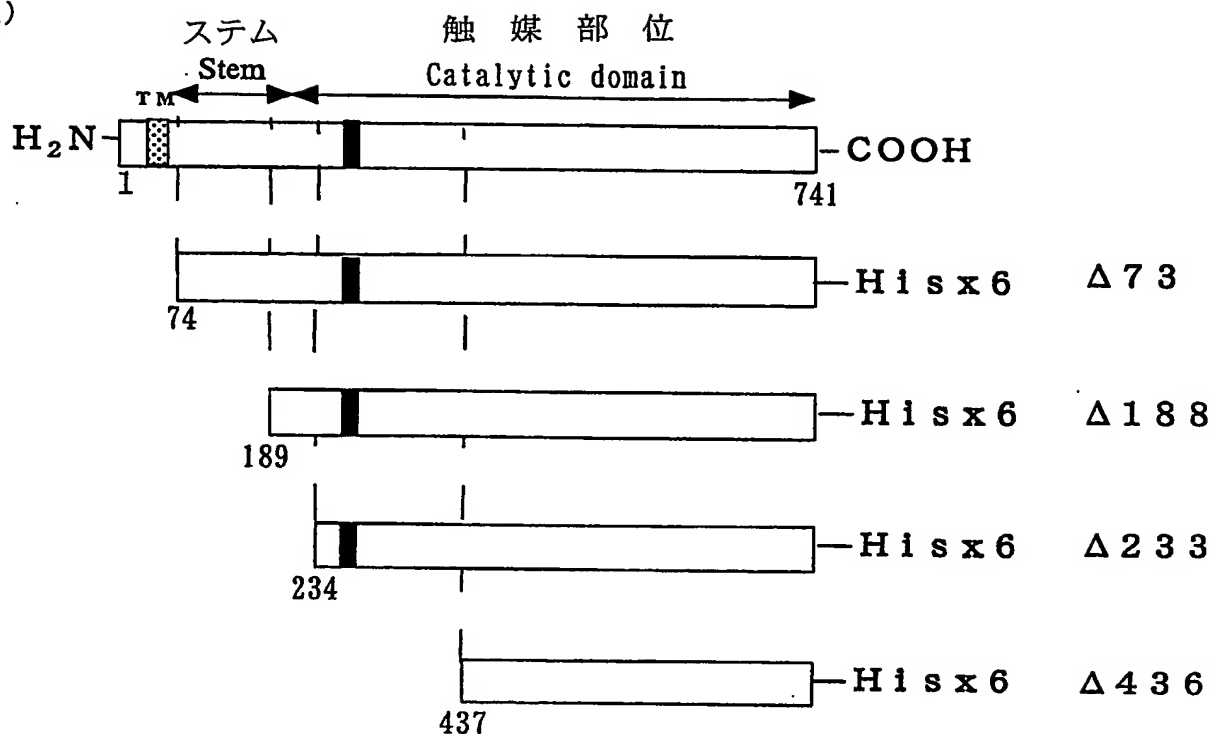


第2図

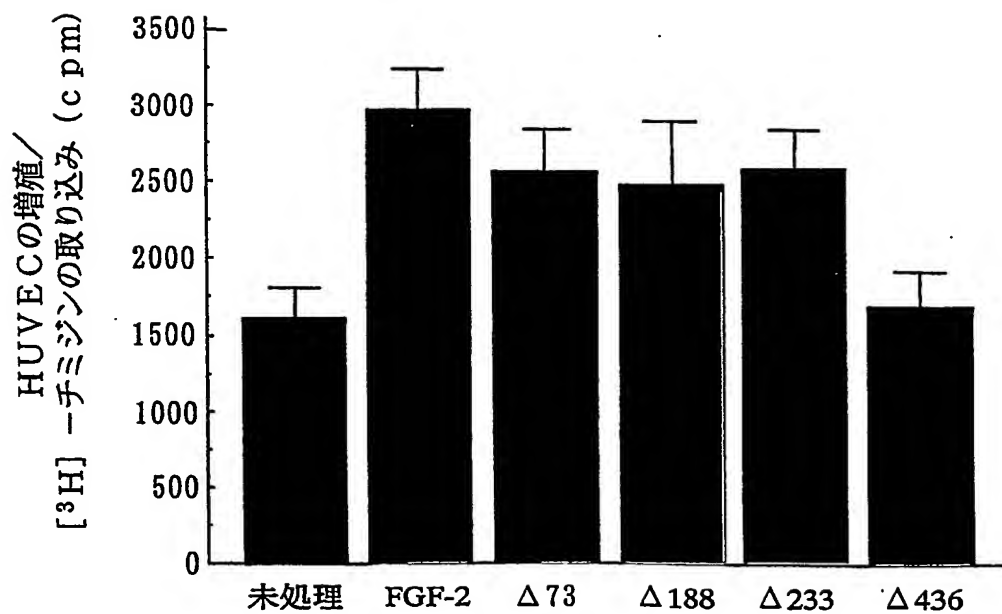


第3図

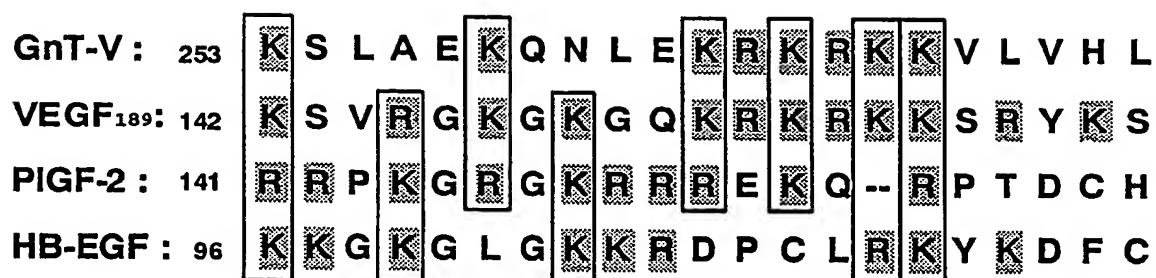
(A)



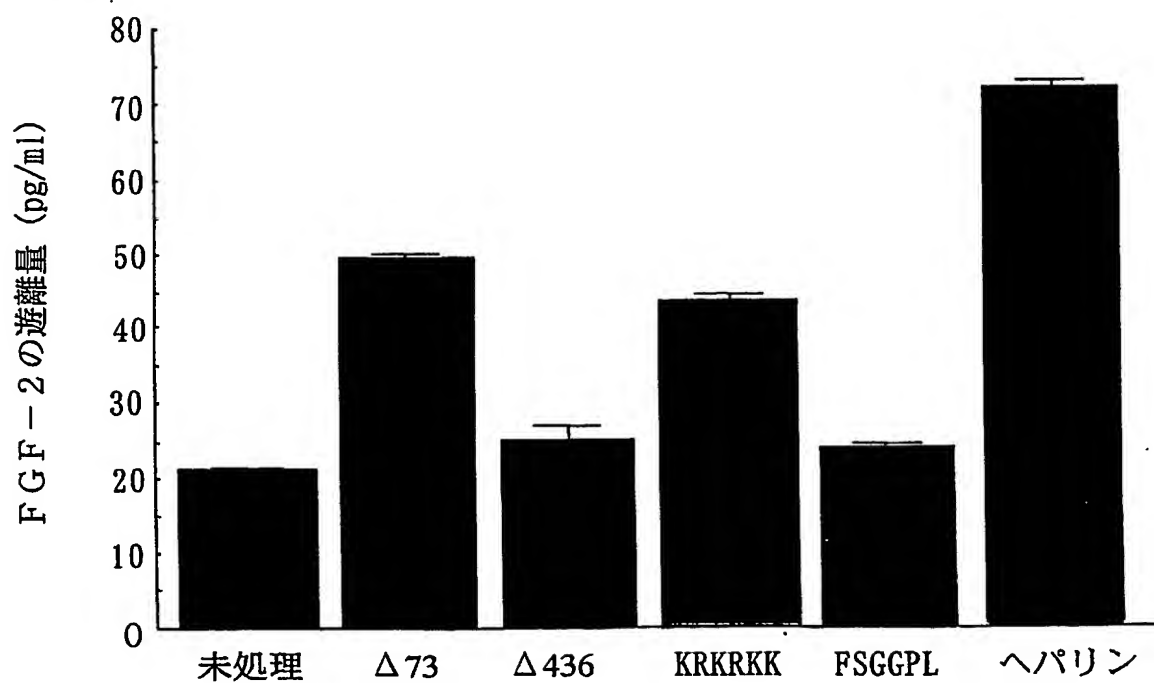
(B)



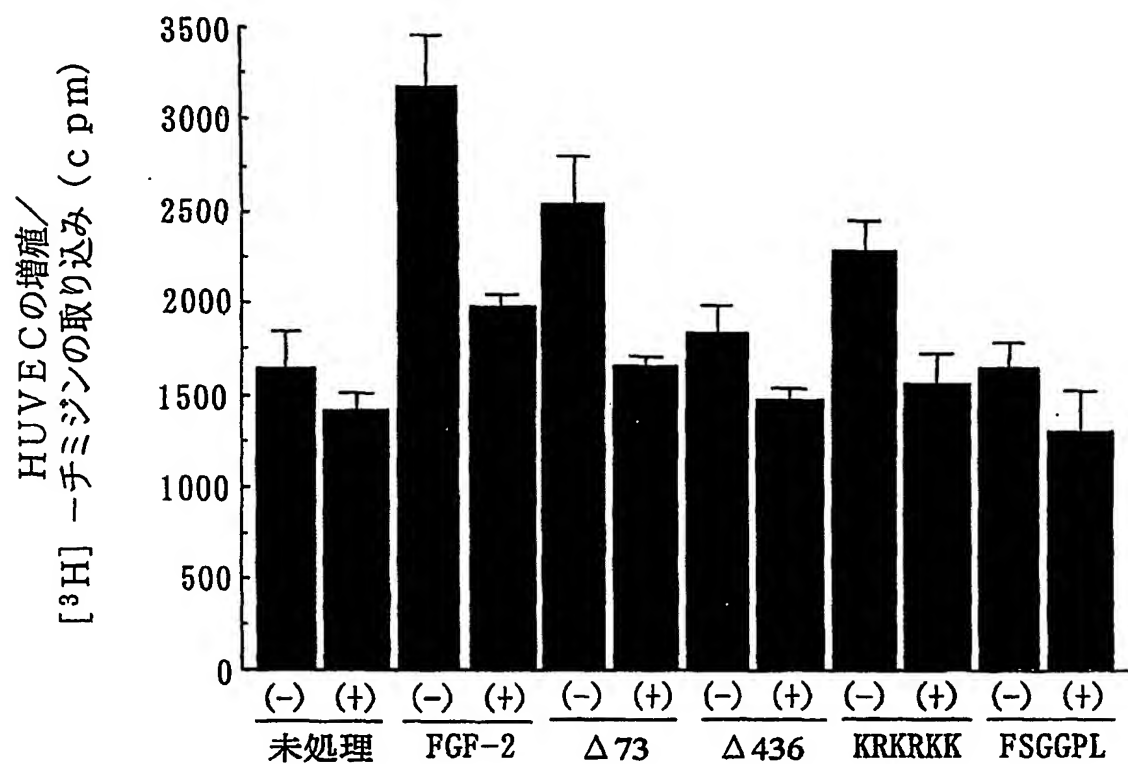
第4図



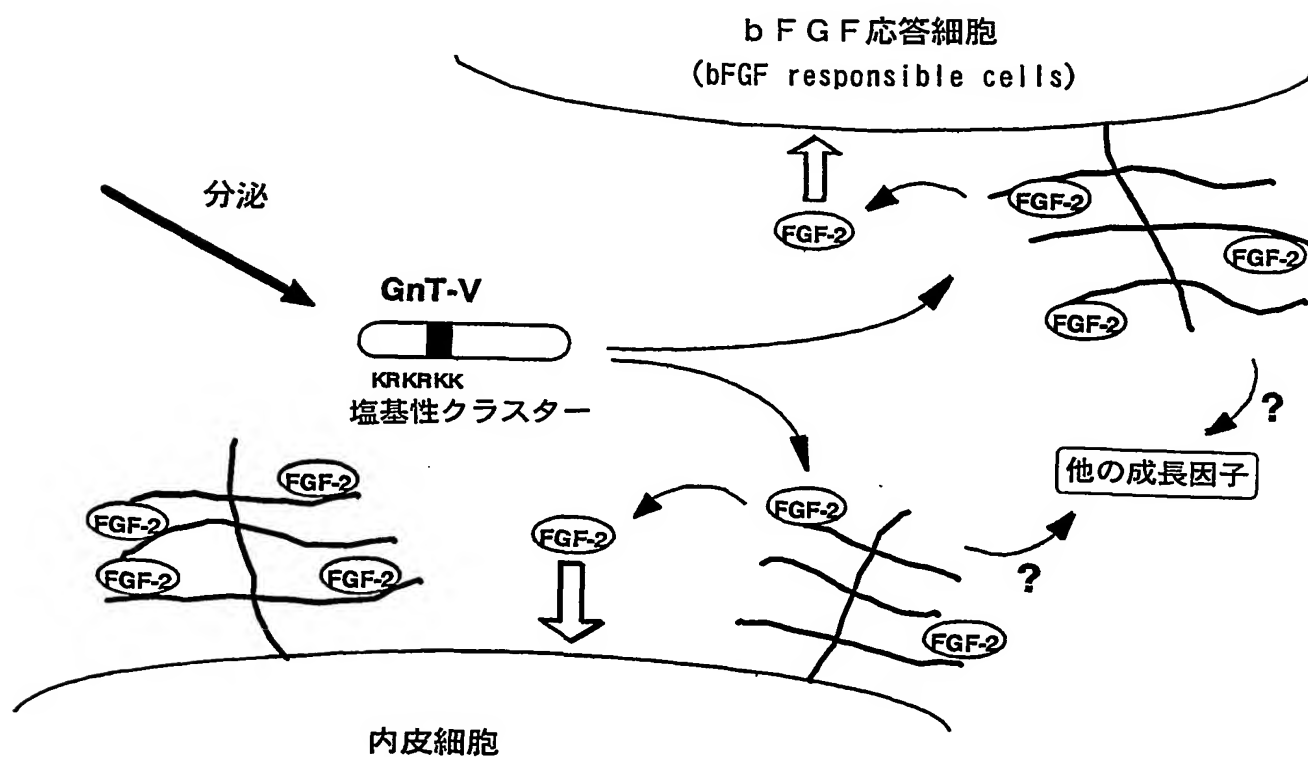
第5図



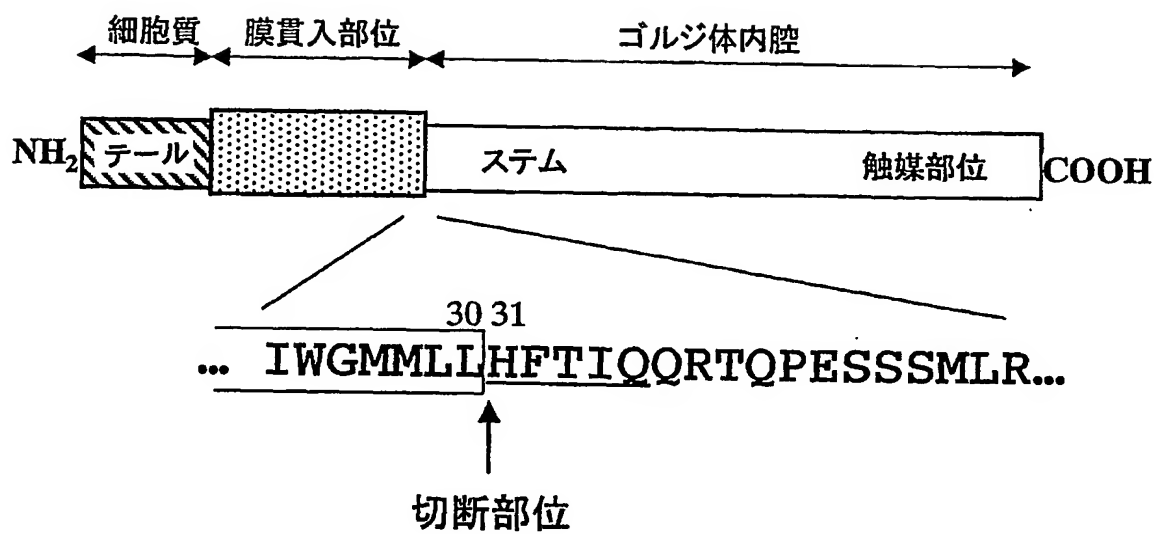
第 6 図



第7図



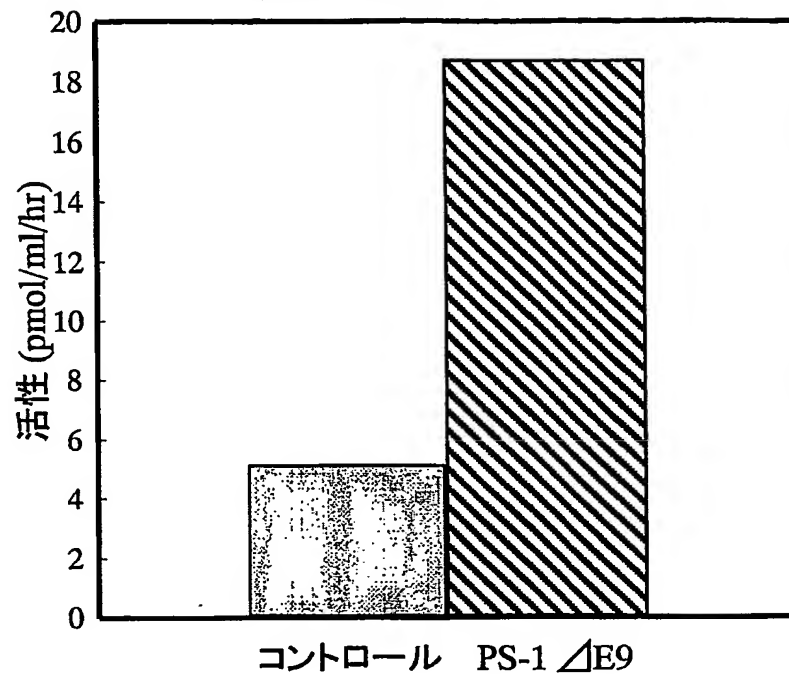
第8図



第9図

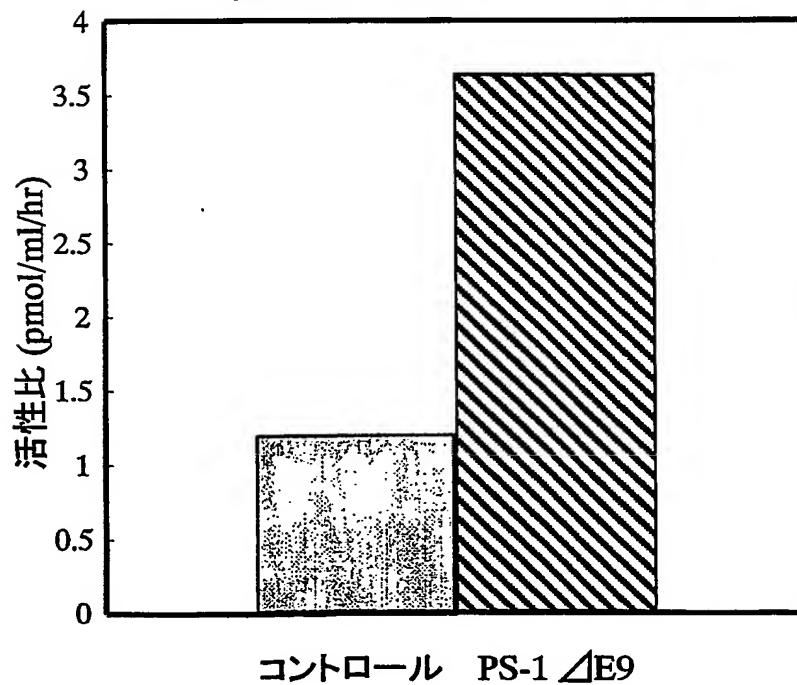
A

培地中のGnT-V活性



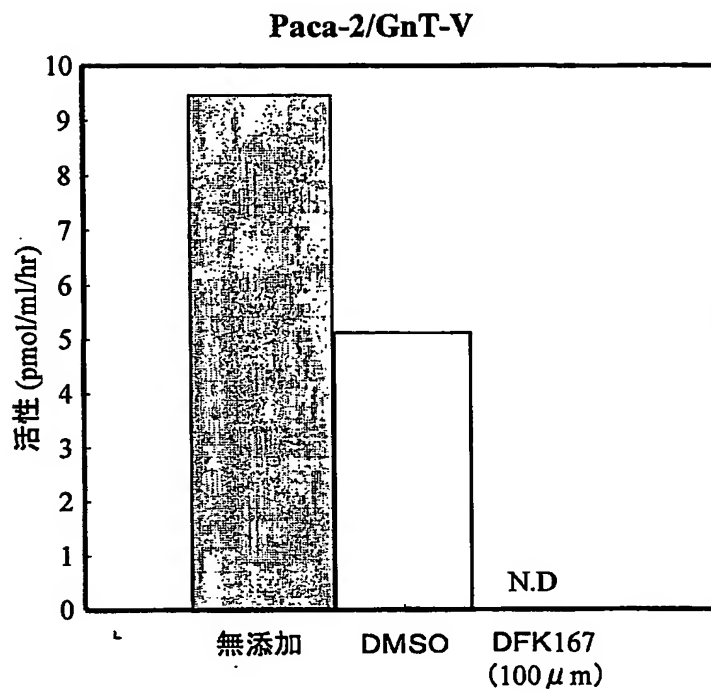
B

細胞外／内のGnT-V活性比

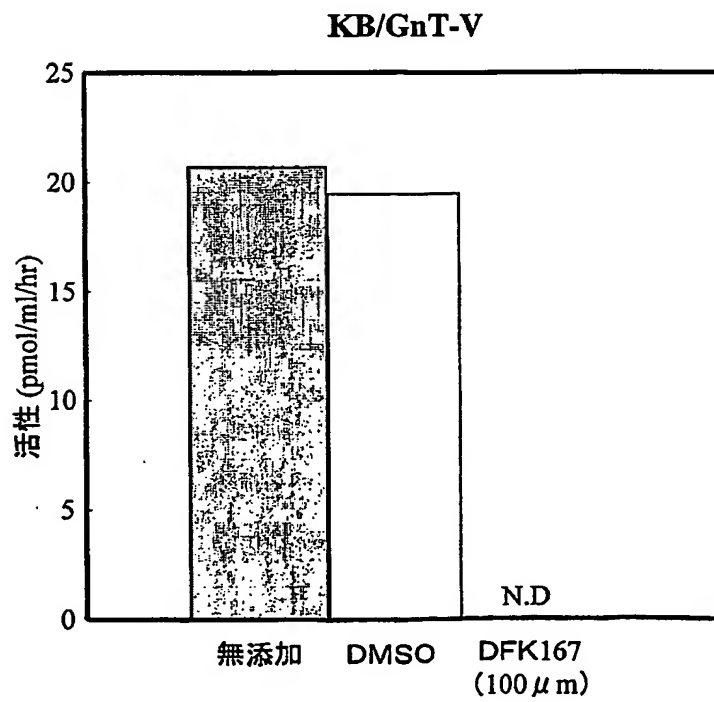


第10図

A



B



Sequence Listing

<110> SUNTORY LIMITED

<120> Glycosyltransferase GnT-V having angiogenic activity

<130> DS07F927

<150> JP 2002-002056

<151> 2002-01-09

<160> 13

<210> 1

<211> 5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Thr Pro Trp Gly Lys

1

5

<210> 2

<211> 6

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Asn Ile Pro Ser Tyr Val

1

5

<210> 3

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

Val Leu Asp Ser Phe Gly Thr Glu Pro Glu Phe Asn His Ala Asn Tyr

1

5

10

15

Ala

<210> 4

<211> 6

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

Asp Leu Gln Phe Leu Leu

1

5

<210> 5

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 5

Asn Thr Asp Phe Phe Ile Gly

1

5

<210> 6

<211> 2095

<212> cDNA

<213> Homo sapiens

<400> 6

CCGGCTGAAG CATCAGAATG GAAGTGAGGA AAGGCAACCA GCTGACACAG GAGCCAGAGT 60

GAGACCAGCA GACTCTCACA CTCAACCTAC ACCATGAATT TGTGTCTATC TTCTACGCGT 120

TAAGAGCCAA GGACAGGTGA AGTTGCCAGA GAGCA ATG GCT CTC TTC ACT CCG 173

Met Ala Leu Phe Thr Pro

1

5

TGG AAG TTG TCC TCT CAG AAG CTG GGC TTT TTC CTG GTG ACT TTT GGC 221

Trp Lys Leu Ser Ser Gln Lys Leu Gly Phe Phe Leu Val Thr Phe Gly

10

15

20

TTC ATT TGG GGT ATG ATG CTT CTG CAC TTT ACC ATC CAG CAG CGA ACT 269

Phe Ile Trp Gly Met Met Leu Leu His Phe Thr Ile Gln Gln Arg Thr

25

30

35

CAG CCT GAA AGC AGC TCC ATG CTG CGC GAG CAG ATC CTG GAC CTC AGC	317
Gln Pro Glu Ser Ser Ser Met Leu Arg Glu Gln Ile Leu Asp Leu Ser	
40 45 50	
AAA AGG TAC ATC AAG GCA CTG GCA GAA GAA AAC AGG AAT GTG GTG GAT	365
Lys Arg Tyr Ile Lys Ala Leu Ala Glu Glu Asn Arg Asn Val Val Asp	
55 60 65 70	
GGG CCA TAC GCT GGA GTC ATG ACA GCT TAT GAT CTG AAG AAA ACC CTT	413
Gly Pro Tyr Ala Gly Val Met Thr Ala Tyr Asp Leu Lys Lys Thr Leu	
75 80 85	
GCT GTG TTA TTA GAT AAC ATT TTG CAG CGC ATT GGC AAG TTG GAG TCG	461
Ala Val Leu Leu Asp Asn Ile Leu Gln Arg Ile Gly Lys Leu Glu Ser	
90 95 100	
AAG GTG GAC AAT CTT GTT GTC AAT GGC ACC GGA ACA AAC TCA ACC AAC	509
Lys Val Asp Asn Leu Val Val Asn Gly Thr Gly Thr Asn Ser Thr Asn	
105 110 115	
TCC ACT ACA GCT GTT CCC AGC TTG GTT GCA CTT GAG AAA ATT AAT GTG	557
Ser Thr Thr Ala Val Pro Ser Leu Val Ala Leu Glu Lys Ile Asn Val	
120 125 130	
GCA GAT ATC ATT AAC GGA GCT CAA GAA AAA TGT GTA TTG CCT CCT ATG	605
Ala Asp Ile Ile Asn Gly Ala Gln Glu Lys Cys Val Leu Pro Pro Met	
135 140 145 150	
GAC GGC TAC CCT CAC TGT GAG GGA AAG ATC AAG TGG ATG AAA GAC ATG	653
Asp Gly Tyr Pro His Cys Glu Gly Lys Ile Lys Trp Met Lys Asp Met	
155 160 165	
TGG CGT TCA GAT CCC TGC TAC GCA GAC TAT GGA GTG GAT GGA TCC ACC	701
Trp Arg Ser Asp Pro Cys Tyr Ala Asp Tyr Gly Val Asp Gly Ser Thr	
170 175 180	

TGC TCT TTT TTT ATT TAC CTC AGT GAG GTT GAA AAT TGG TGT CCT CAT	749
Cys Ser Phe Phe Ile Tyr Leu Ser Glu Val Glu Asn Trp Cys Pro His	
185 190 195	
TTA CCT TGG AGA GCA AAA AAT CCC TAC GAA GAA GCT GAT CAT AAT TCA	797
Leu Pro Trp Arg Ala Lys Asn Pro Tyr Glu Glu Ala Asp His Asn Ser	
200 205 210	
TTG GCG GAA ATT CGT ACA GAT TTT AAT ATT CTC TAC AGT ATG ATG AAA	845
Leu Ala Glu Ile Arg Thr Asp Phe Asn Ile Leu Tyr Ser Met Met Lys	
215 220 225 230	
AAG CAT GAA GAA TTC CGG TGG ATG AGA CTA CGG ATC CGG CGA ATG GCT	893
Lys His Glu Glu Phe Arg Trp Met Arg Leu Arg Ile Arg Arg Met Ala	
235 240 245	
GAC GCA TGG ATC CAA GCA ATC AAG TCC CTG GCA GAA AAG CAG AAC CTT	941
Asp Ala Trp Ile Gln Ala Ile Lys Ser Leu Ala Glu Lys Gln Asn Leu	
250 255 260	
GAA AAG AGA AAG CGG AAG AAA GTC CTC GTT CAC CTG GGA CTC CTG ACC	989
Glu Lys Arg Lys Arg Lys Lys Val Leu Val His Leu Gly Leu Leu Thr	
265 270 275	
AAG GAA TCT GGA TTT AAG ATT GCA GAG ACA GCT TTC AGT GGT GGC CCT	1037
Lys Glu Ser Gly Phe Lys Ile Ala Glu Thr Ala Phe Ser Gly Gly Pro	
280 285 290	
CTT GGT GAA TTA GTT CAA TGG AGT GAT TTA ATT ACA TCT CTG TAC TTA	1085
Leu Gly Glu Leu Val Gln Trp Ser Asp Leu Ile Thr Ser Leu Tyr Leu	
295 300 305 310	
CTG GGC CAT GAC ATT AGG ATT TCA GCT TCA CTG GCT GAG CTC AAG GAA	1133
Leu Gly His Asp Ile Arg Ile Ser Ala Ser Leu Ala Glu Leu Lys Glu	
315 320 325	

ATC ATG AAG AAG GTT GTA GGA AAC CGA TCT GGC TGC CCA ACT GTA GGA	1181
Ile Met Lys Lys Val Val Gly Asn Arg Ser Gly Cys Pro Thr Val Gly	
330 335 340	
GAC AGA ATT GTT GAG CTC ATT TAC ATT GAT ATT GTA GGA CTT GCT CAA	1229
Asp Arg Ile Val Glu Leu Ile Tyr Ile Asp Ile Val Gly Leu Ala Gln	
345 350 355	
TTC AAG AAA ACT CTT GGA CCA TCC TGG GTT CAT TAC CAG TGC ATG CTC	1277
Phe Lys Lys Thr Leu Gly Pro Ser Trp Val His Tyr Gln Cys Met Leu	
360 365 370	
CGA GTC CTT GAT TCA TTT GGT ACT GAA CCC GAA TTT AAT CAT GCA AAT	1325
Arg Val Leu Asp Ser Phe Gly Thr Glu Pro Glu Phe Asn His Ala Asn	
375 380 385 390	
TAT GCC CAA TCG AAA GGC CAC AAG ACC CCT TGG GGA AAA TGG AAT CTG	1373
Tyr Ala Gln Ser Lys Gly His Lys Thr Pro Trp Gly Lys Trp Asn Leu	
395 400 405	
AAC CCT CAG CAG TTT TAT ACC ATG TTC CCT CAT ACC CCA GAC AAC AGC	1421
Asn Pro Gln Gln Phe Tyr Thr Met Phe Pro His Thr Pro Asp Asn Ser	
410 415 420	
TTT CTG GGG TTT GTG GTT GAG CAG CAC CTG AAC TCC AGT GAT ATC CAC	1469
Phe Leu Gly Phe Val Val Glu Gln His Leu Asn Ser Ser Asp Ile His	
425 430 435	
CAC ATT AAT GAA ATC AAA AGG CAG AAC CAG TCC CTT GTG TAT GGC AAA	1517
His Ile Asn Glu Ile Lys Arg Gln Asn Gln Ser Leu Val Tyr Gly Lys	
440 445 450	
GTG GAT AGC TTC TGG AAG AAT AAG AAG ATC TAC TTG GAC ATT ATT CAC	1565
Val Asp Ser Phe Trp Lys Asn Lys Lys Ile Tyr Leu Asp Ile Ile His	
455 460 465 470	

ACA TAC ATG GAA GTG CAT GCA ACT GTT TAT GGC TCC AGC ACA AAG AAT	1613
Thr Tyr Met Glu Val His Ala Thr Val Tyr Gly Ser Ser Thr Lys Asn	
475 480 485	
ATT CCC AGT TAC GTG AAA AAC CAT GGT ATC CTC AGT GGA CGG GAC CTG	1661
Ile Pro Ser Tyr Val Lys Asn His Gly Ile Leu Ser Gly Arg Asp Leu	
490 495 500	
CAG TTC CTT CTT CGA GAA ACC AAG TTG TTT GTT GGA CTT GGG TTC CCT	1709
Gln Phe Leu Leu Arg Glu Thr Lys Leu Phe Val Gly Leu Gly Phe Pro	
505 510 515	
TAC GAG GGC CCA GCT CCC CTG GAA GCT ATC GCA AAT GGA TGT GCT TTT	1757
Tyr Glu Gly Pro Ala Pro Leu Glu Ala Ile Ala Asn Gly Cys Ala Phe	
520 525 530	
CTG AAT CCC AAG TTC AAC CCA CCC AAA AGC AGC AAA AAC ACA GAC TTT	1805
Leu Asn Pro Lys Phe Asn Pro Pro Lys Ser Ser Lys Asn Thr Asp Phe	
535 540 545 550	
TTC ATT GGC AAG CCA ACT CTG AGA GAG CTG ACA TCC CAG CAT CCT TAC	1853
Phe Ile Gly Lys Pro Thr Leu Arg Glu Leu Thr Ser Gln His Pro Tyr	
555 560 565	
GCT GAA GTT TTC ATC GGG CGG CCA CAT GTG TGG ACT GTT GAC CTC AAC	1901
Ala Glu Val Phe Ile Gly Arg Pro His Val Trp Thr Val Asp Leu Asn	
570 575 580	
AAT CAG GAG GAA GTA GAG GAT GCA GTG AAA GCA ATT TTA AAT CAG AAG	1949
Asn Gln Glu Glu Val Glu Asp Ala Val Lys Ala Ile Leu Asn Gln Lys	
585 590 595	
ATT GAG CCA TAC ATG CCA TAT GAA TTT ACG TGC GAG GGG ATG CTA CAG	1997
Ile Glu Pro Tyr Met Pro Tyr Glu Phe Thr Cys Glu Gly Met Leu Gln	
600 605 610	

AGA ATC AAT GCT TTC ATT GAA AAA CAG GAC TTC TGC CAT GGG CAA GTG 2045
Arg Ile Asn Ala Phe Ile Glu Lys Gln Asp Phe Cys His Gly Gln Val
615 620 625 630

ATG TGG CCA CCC CTC AGC GCC CTA CAG GTC AAG CTT GCT GAG CCC GGG 2093
Met Trp Pro Pro Leu Ser Ala Leu Gln Val Lys Leu Ala Glu Pro Gly
635 640 645

CC 2095

<210> 7

<211> 16

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 7

Lys Ser Leu Ala Glu Lys Gln Asn Leu Glu Lys Arg Lys Arg Lys Lys
1 5 10 15

<210> 8

<211> 24

<212> cDNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>

<400> 8

GGGAGTGAGG ATGATGTAGG GAAG 24

<210> 9

<211> 24

<212> cDNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>

<400> 9

ATGGGGCAGA GGAACCTACG TTAT 24

<210> 10

<211> 6

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 10

Gly Arg Gly Lys Arg Arg

1

5

<210> 11

<211> 6

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<223> KRKRKK peptide

<400> 11

Lys Arg Lys Arg Lys Lys

1

5

<210> 12

<211> 6

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<223> FSGGPL peptide

<400> 12

Phe Ser Gly Gly Pro Leu

1

5

<210> 13

<211> 5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 13

His Phe Thr Ile Gln

1

5

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/JP02/13879

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C12N15/54, C12N15/12, C12N9/10, C07K14/515, A61K38/17

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C12N15/54, C12N15/12, C12N9/10, C07K14/515, A61K38/17

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CA(STN), BIOSIS(DIALOG), WPI(DIALOG),
SwissProt/PIR/Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EP 585109 A (Suntory Ltd.), 02 March 1994 (02.03.94), Claim 1; sequence No. 8 & JP 6-197756 A & US 5707846 A	1-5
X	MURATA K. et al., Expression of N-acetylglucosaminyltransferase V in colorectal cancer correlates with metastasis and poor prognosis., Clin.Cancer.Res., 2000, Vol.6, No.5, p.1772-7.	20-22



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T"

later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X"

document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y"

document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&"

document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
08 April, 2003 (08.04.03)Date of mailing of the international search report
22 April, 2003 (22.04.03)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PC/P02/13879

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	SASAI K. et al., The critical role of the stem region as a functional domain responsible for the oligomerization and golgi localization of N-acetylglucosaminyltransferase V. J.Biol.Chem., 2001, Vol.276, No.1, pages 759 to 765	1-13,19-22
A	WOLFE M.S. et al., A substrate-based difluoro ketone selectively inhibits Alzheimer's γ -secretase activity., J.Med.Chem. 1998, Vol.41, pages 6 to 9	11,13,19
A	TANIGUCHI N. et al., Implication of N-acetylglucosaminyltransferases III and V in cancer: gene regulation and signaling mechanism., Biochemica et Biophysica Acta 1999, Vol.1455, pages 287 to 300	6-10
A	JP 9-84582 A (Kirin Brewery Co., Ltd.), 31 March, 1997 (31.03.97), (Family: none)	9,10
P,X	SAITO T. et al., A secreted type of β 1,6-N-acetylglucosaminyltransferase V (GnT-V) induces tumor angiogenesis without mediation of glycosylation., J.Biol.Chem. 2002, Vol.277, No.19, pages 17002 to 17008	1-13,19-22

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/JP02/13879

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☒ Claims Nos.: 14-18
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
Concerning the compounds as set forth in claims 14, 17 and 18, no specific compound but a compound DFK167 is disclosed in the description (p. 38). Therefore, it is unknown what compounds other than DFK167 are involved in the scope thereof. Thus, the above claims are (continued to extra sheet)

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/JP02/13879

Continuation of Box No.I-2 of continuation of first sheet(1)

described in an extremely unclear manner and no meaningful international search can be made thereon.

Concerning the compounds as set forth in claims 15 and 16, it is completely unknown what specific compounds are involved in the scope thereof and what are not, though the statement in the description is taken into consideration. Therefore, claims 15 to 17 are described in an extremely unclear manner and no meaningful international search can be made thereon.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ C12N15/54, C12N15/12, C12N9/10, C07K14/515, A61K38/17

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ C12N15/54, C12N15/12, C12N9/10, C07K14/515, A61K38/17

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CA (STN), BIOSIS (DIALOG), WPI (DIALOG)

SwissProt/PIR/Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	EP 585109 A2 (サントリー) 1994. 03. 02 & JP 6-197756 A & US 5707846 A 請求項 1 及び配列番号 8 参照	1-5
X	Murata K. et al., Expression of N-acetylglucosaminyltransferase V in colorectal cancer correlates with metastasis and poor prognosis., Clin Cancer Res. 2000, Vol. 6, No. 5, p. 1772-7.	20-22

☒ C 欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の 1 以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

08. 04. 03

国際調査報告の発送日

22.04.03

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目 4 番 3 号

特許庁審査官 (権限のある職員)

鈴木 恵理子

4 B

3 0 3 7

電話番号 03-3581-1101 内線 3488

C (続き). 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	SASAI K. et al., The critical role of the stem region as a functional domain responsible for the oligomerization and golgi localization of N-acetylglucosaminyltransferase V. J.Biol.Chem. 2001, Vol.276, No.1, p.759-765	1-13, 19-22
A	WOLFE M.S. et al., A substrate-based difluoro ketone selectively inhibits Alzheimer's γ -secretase activity., J.Med.Chem. 1998, Vol.41, p.6-9	11, 13, 19
A	TANIGUCHI N. et al., Implication of N-acetylglucosaminyltransferases III and V in cancer: gene regulation and signaling mechanism., Biochimica et Biophysica Acta 1999, Vol.1455, p.287-300	6-10
A	JP 9-84582 A (麒麟麦酒) 1997.03.31 (ファミリーなし)	9, 10
P, X	SAITO T. et al., A secreted type of β 1,6-N-acetylglucosaminyltransferase V (GnT-V) induces tumor angiogenesis without mediation of glycosylation., J.Biol.Chem. 2002, Vol.277, No.19, p.17002-17008	1-13, 19-22

第 I 欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第 1 ページの 2 の続き)

法第 8 条第 3 項 (P C T 1 7 条 (2) (a)) の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☐ 請求の範囲 _____ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。
つまり、
2. ☒ 請求の範囲 1 4 - 1 8 は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
請求の範囲 1 4、1 7、1 8 に記載の化合物について、明細書第 3 8 頁を参照すると、DFK167 なる化合物が開示されているのみで、それ以外のものについては具体的に記載されていない。したがって、該化合物には DFK167 以外にどのようなものが包含されるかが不明であるから、前記請求の範囲の記載は著しく不明確であり、有意義な国際調査をすることができない。 (以下、「特別ページ」に続く)
3. ☐ 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であって P C T 規則 6. 4 (a) の第 2 文及び第 3 文の規定に従って記載されていない。

第 II 欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第 1 ページの 3 の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるところの国際調査機関は認めた。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。

「第 I 欄 2.」の続き

また、請求の範囲 15 および 16 に記載の化合物については、明細書の記載を参酌しても、具体的にどのような化合物が包含され、どのような化合物が包含されないのかが全く不明であるから、当該請求の範囲 15 ～ 17 の記載は著しく不明確であり、有意義な国際調査をすることができない。